Bol. Mus. Nac. Hist. Nat. Chile 35: 121-163, (1977).

TRANSPORTE DE CLORO Y DE SODIO A TRAVES DE LA PIEL *IN SITU* DE ANFIBIOS SUDAMERICANOS

Primera Parte

ALFREDO SALIBIÁN *

INTRODUCCION GENERAL

1. Generalidades.

La Clase Amphibia constituye un eslabón crítico en la colonización de la tierra [1]. De las dos mil especies de batracios actuales, las salamandras y tritones (Subclase Urodela o Caudata) se encuentran mayormente en las zonas templadas del Hemisferio Norte. Los sapos y ranas (Subclase Anura o Salientia) tienen una distribución mucho mayor, desde el Artico hasta las zonas desérticas de Africa, Australia y América. La tercera Subclase, Apoda, está confinada a zonas tropicales y es, posiblemente, la más pequeña y la menos conocida desde el punto de vista fisiológico. El continente Antártico no posee Anfibios vivientes [2].

La Paleontología nos informa acerca de la estrecha relación que liga a los anfibios con los peces por un lado, y con los reptiles por otro. Se trata de un proceso que empezó en el Devónico (o posiblemente en el Silúrico) cuando los crosopterigios originaron a los antecesores de los anfibios actuales, los laberintodontes, y que se completa al final del Paleozoico, cuando una parte de ellos da lugar a los reptiles (ROMER, 1972, 1973; SZARSKI, 1962).

La transición de peces ⟶ anfibios, primera etapa de la transición vida acuática ⟶ vida terrestre, implica una serie de adaptaciones morfológicas (CARROLL, 1970; ROMER, 1972; SCHAEFFER, 1969; SCHMALHAUSEN, 1968) y fisiológicas (BENTLEY, 1966 a; GANS, 1970; SCHMALHAUSEN, *op. cit.*; THOMSON, 1971; WHITFORD, 1973). De éstas, quizás las más importantes están asociadas a la vida en un medio de sequía estacional que favoreció tanto la selección de adaptaciones a la respiración aérea como las modificaciones que permitieran mantener adecuadamente su equilibrio hidrosalino.

La branquia, y en mucho menor grado el intestino, es el lugar por el que los peces dulceacuícolas regulan su equilibrio hidroelectrolítico (MAETZ, 1971); es en ella donde se hace el pasaje de agua y en donde se intercambian iones monovalentes del medio externo por otras especies endógenas (MAETZ, 1970; MOTAIS y GARCÍA ROMEU, 1972). Prácticamente en todos los peces de agua dulce la piel es una estructura inerte frente a los cambios del medio; en cambio, la de los anfibios adultos tiene un rol preponderante en este tipo de intercambio constituyendo la estructura que permite captar agua, iones, y es, además, el lugar

---

[1] El nombre de la Clase (del griego *amphi*, doble y *bios*, vida), acuñado por LINNEO, apunta al hecho de que la mayor parte de las especies actuales habita en la tierra y pasa parte de su vida en el agua dulce. Sin embargo, dicho carácter "anfibio" no es exclusivo de los batracios.

[2] Son interesantes los hallazgos recientes de numerosos restos fósiles de laberintodontes en el Triásico Inferior de Antártida (véase, PÉFAUR, 1972). Este importante descubrimiento es una valiosa evidencia en favor de la deriva continental y de la ligazón que hubo entre dicho continente y algún otro del Hemisferio Sur.

* Cátedra de Fisiología Animal Comparada, Universidad Nacional del Comahue, Centro Regional Bariloche, 8.400 S.C. de Bariloche, Río Negro, Argentina.
Dirección actual: Departamento de Política Científica y Tecnológica, Universidad Nacional de Luján, 6700 Luján, Bs. As., Argentina.

por donde se hace gran parte del intercambio gaseoso. Asimismo, lo que en adelante llamaremos "sistema renal" (vejiga urinaria y riñón), pasa a ocupar un lugar destacado en la preservación del balance hidromineral (BENTLEY 1966 *b*, 1971).

Debido al gradiente osmótico que existe entre su medio interno y el externo, los peces de agua dulce deben desprenderse del agua que los invade constantemente. Dicho exceso de agua se ilimina por el riñón que emite copiosas cantidades de orina hipotónica (LAHLOU, 1970). Los batracios, por el contrario, debido a las características de su habitat, enfrentan el problema inverso: la desecación; en este sentido, su problemática es similar a la de los teleósteos marinos.

2. Captación de iones por la piel de anfibios.

— *Estructura esquemática de la piel.* La piel de los anfibios es una compleja estructura que es objeto de estudio desde hace varios años. La mayor parte de la información que sigue fue tomada de los estudios de FARQUHAR y PALADE (1964, 1965, 1966) sobre material proveniente de diversos anuros y urodelos.

En la Figura 1 se representan, en forma esquemática, las capas que la constituyen. Las células del *stratum corneum* son escamosas, parcialmente cornificadas, y están unidas entre sí por los *zonula occludens* y constituyen la única estructura continua de la piel. Las células de los otros *strata* están en contacto por *desmosomas.* El *s. granulosum* y el *s. spinosum* están formados por células cúbicas o poliédricas; el *s. germinativum* está formado por células columnares o cúbicas. El *corium* (tejido conectivo) contiene glándulas, cromatóforos y fibras musculares.

El espesor total de la piel de los anfibios varía de una especie a otra, siendo el *corium* unas 4-5 veces más ancho que la epidermis (CZOPECK, 1962, 1967). Mediciones efectuadas por nosotros [3] indican que la dermis de *Calyptocephalella caudiverbera* recién capturada es 4.5 veces más ancha que la epidermis; el espesor total de la piel oscila alrededor de 0.9 mm.

En la Figura 2 se representan, también de manera simplificada, las inter-relaciones de los diferentes tipos celulares de la epidermis.

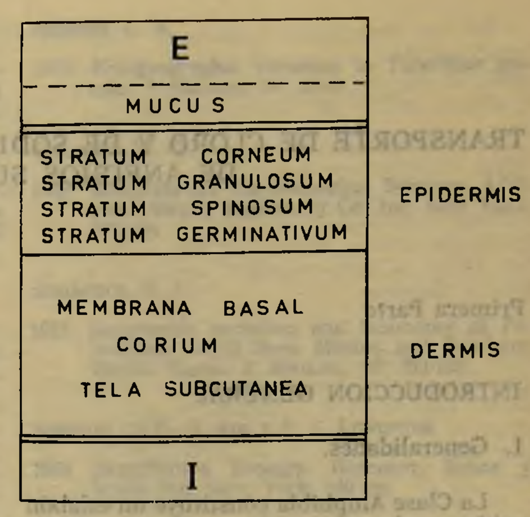


FIG. 1. Capas celulares de la piel de anfibios; E: medio externo, I: medio interno.

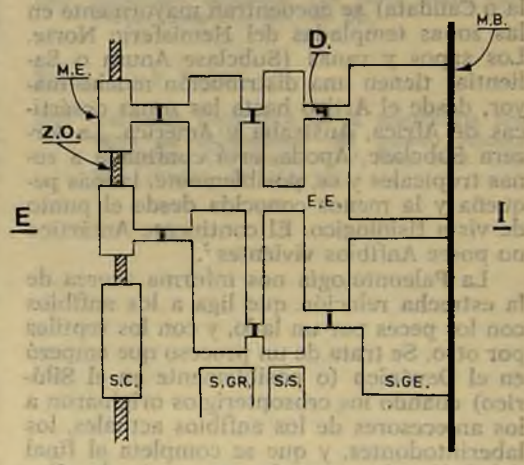


FIG. 2. Representación esquemática de las capas celulares de la epidermis de anfibios. E: exterior; I: medio interno; ME: membrana externa; ZO: *zonula occludens;* D: desmosomas; SC: *stratum corneum;* S.GR: *stratum granulosum;* S.GE: *stratum germinativum;* MB: membrana basal; EE: espacio extracelular.

[3] En colaboración con los Dres. S. A. MORENO y D. CROVARI hemos iniciado un estudio sobre la morfología de la piel de la rana chilena; la Figura 3 es parte de dicho trabajo (en preparación).

En un trabajo reciente histoquímico de VAN LENNEP y KOMNICK (1971) se sugiere que el mucus que generalmente cubre la epidermis de muchos anfibios, puede jugar un papel no despreciable en el transporte de iones absorbiendo Cl^- (y posiblemente Na^+).

En la Figura 3 se muestra, por último, la imagen microscópica (óptica) de la piel de *C. caudiverbera*; sus características se corresponden, de manera general, con las descritas para otros anuros.

— *El modelo de* KOEFOED–JOHNSEN y USSING. De 1935 data la primera comunicación (HUF) dando cuenta de la capacidad de la piel aislada de transportar activamente Na^+. Poco después, KROGH (1937) demostró que la piel *in situ* también era capaz de absorber iones desde soluciones muy diluídas. A partir de entonces, la bibliografía muestra una gran masa de información acerca de las propiedades "transportadoras" de la piel de anfibios. La mayor parte de la misma se obtuvo gracias a una preparación diseñada por USSING y ZERAHN (1951) la que con ligeras variantes sigue siendo utilizada no sólo para el estudio de los flujos iónicos a través de la piel, sino también para el de otros epitelios.

Cuando un trozo de piel ventral de anfibio es colocado separando dos soluciones de igual concentración, se genera una diferencia de potencial transepitelial de aproximadamente 100 mV, siendo el lado interno (o seroso) positivo. Se demostró que la corriente necesaria para anular dicho potencial espontáneo ("corriente de corto circuito") es una medida indirecta y proporcional del transporte de Na^+ desde el lado externo (o mucoso) al interior (USSING y ZERAHN, *op. cit.*). Asimismo, bajo condiciones de corto circuito, es posible distinguir los flujos iónicos activos de los pasivos; en ausencia de gradientes de concentración, los flujos unidireccionales son iguales en el caso de los elementos transportados pasivamente (véase LINDLEY, 1970).

La Figura 4 (tomada de USSING, 1960) ilustra esquemáticamente el modelo que estamos discutiendo.

Básicamente, el modelo que en lo sucesivo llamaremos "de USSING" (KOEFOED-JOHNSEN y USSING, 1958) establece que:



FIG. 3. Imagen al microscopio óptico de la piel ventral de *Calyptocephalella caudiverbera* 63 x.

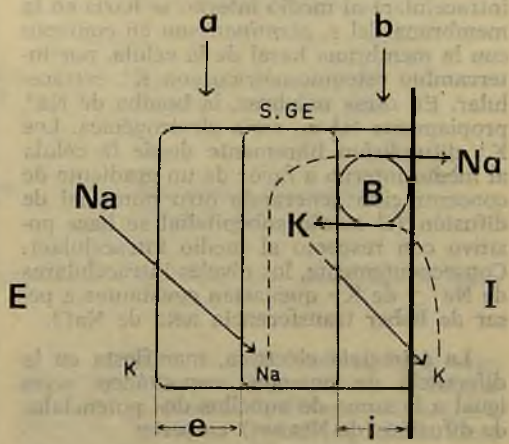


FIG. 4. Modelo de transporte de Na^+ de KOEFOED-JOHNSEN y USSING; E: exterior; I: medio interno; S.GE: *stratum germinativum;* e: cara externa del S.GE; i: cara interna del S.GE; B: bomba de sodio. La flecha *a* indica el sitio del primer potencial; la flecha *b* señala el lugar del segundo potencial de difusión.

a) la piel "normal" (no cortocircuitada o en circuito "abierto") transporta Na^+ en contra de gradientes eléctricos y químicos (transporte activo); el Cl^- acompaña pasivamente al Na^+, por arrastre electrostático,

b) La piel en corto circuito transporta Na^+ (también activamente) y su flujo neto es proporcional a la corriente necesaria para anular aquélla diferencia de potencial espontáneo, y

c) El potencial eléctrico transepitelial aumenta proporcionalmente con el aumento de la concentración de Na^+ en contacto con la epidermis y cuando disminuye la de K^+ en contacto con la cara interna de la piel. La diferencia de potencial y el pasaje de Na^+ y de Cl^- quedan anulados cuando no hay potasio en el lado interno.

Fue sugerida la existencia de dos barreras selectivamente permeables al Na^+ (la externa) y al K^+ (la interna). El Na^+ difunde pasivamente (por gradiente de concentración) desde el exterior al interior de la célula por la membrana externa del *stratum corneum*, la célula se hace positiva (con respecto al exterior) generando una diferencia de potencial. El pasaje de Na^+ (ahora intracelular) al medio interno se haría en la membrana del *s. germinativum* en contacto con la membrana basal de la célula, por intercambio estequiométrico con K^+ extracelular. En otras palabras, la bomba de Na^+ propiamente tal no sería electrogénica. Los K^+ difundirían libremente desde la célula al medio interno a favor de un gradiente de concentración generando otro potencial de difusión (el medio subepitelial se hace positivo con respecto al medio intracelular). Consecuentemente, los niveles intracelulares de Na^+ y de K^+ quedarían constantes a pesar de haber transferencia neta de NaCl.

La asimetría eléctrica, manifiesta en la diferencia de potencial espontáneo, sería igual a la suma de aquéllos dos potenciales de difusión (de NERNST) en serie:

$$E = E_{Na} + E_{K} = RT/F \ln \left(Na_o / Na_c \cdot K_c / K_i \right)$$

donde: E: diferencia de potencial total, E_{Na}: diferencia de potencial en la cara externa, E_K: diferencia de potencial en la cara interna, R, T y F: constantes, Na_o: concentración de Na^+ en el medio externo, Na_c: concentración intracelular de Na^+, K_i: concentración de K^+ en el medio interno y K_c: concentración intracelular de K^+.

Recientemente se han confirmado muchas de las propiedades anteriormente enumeradas en preparaciones de epidermis aislada de *Rana pipiens* (ERLIJ, 1971), *Rana esculenta* (CARASSO, FAVARD, JARD y RAJERISON, 1971) y de *Bufo bufo* (RAWLINS, MATEU, FRAGACHAN y WHITTEMBURY, 1970).

Este esquema de transporte "transcelular" de Na^+ (y de Cl^-) es, hasta hoy, el de mayor difusión a pesar de que el trabajo experimental basado o inspirado en el modelo ha sugerido, con el transcurso del tiempo, algunas modificaciones (USSING, 1969). Más aún, su validez ha sido cuestionada y en su lugar se ha propuesto otro modelo de transporte "pericelular" (CEREIJIDO y ROTUNNO, 1970). Alternativamente, NORRIS y colaboradores (1972) concluyeron, por su parte, que el transporte transepitelial de Na^+ por la piel de *Bufo spinulosus arunco* implica la activa participación de las glándudas coriónicas.

No es nuestro propósito extendernos en la referencia específica a las objeciones que merece el modelo de USSING; el lector interesado puede consultar, además de los trabajos del grupo del Dr. CEREIJIDO, recientes artículos que se ocupan de presentarlas y discutirlas extensamente (HERRERA, 1971; KEYNES, 1969; MOTAIS y GARCÍA ROMEU, 1972).

—*"In vitro" versus "in vivo". Breve análisis crítico.* Con el tiempo se hizo evidente que la información cuali y cuantitativa obtenida por intermedio de preparaciones *in vitro* no era extrapolable a las propiedades de la piel *in situ* [4].

En el caso de la piel aislada de *Rana esculenta* y *R. temporaria*, por ejemplo, sólo se ha podido detectar transporte activo de Na^+ siendo el de Cl^- un pasaje pasivo, tal como lo prevé el modelo de USSING. Sin embargo, JORGENSEN, LEVI y ZERAHN (1954) demostraron en dichas especies la existencia, *in vivo*, de transportes activos de Na^+ y de Cl^-. En la piel aislada de *R. pipiens* también se observó pasaje activo de Cl^- cuando la concentración en el medio es adecuadamente modificada (MARTIN, 1964; MARTIN y CURRAN, 1966).

---

[4] En las páginas que siguen utilizaremos las expresiones *in situ* e *in vivo* como sinónimos, esto es, la piel del animal intacto.

Discrepancias cualitativas como las mencionadas se entienden cuando se recuerda de que en condiciones de corto circuito es prácticamente imposible detectar transporte activo de aniones toda vez que sus electrones son utilizados para transportar la corriente necesaria para anular el potencial espontáneo de la piel aislada (DAVSON, 1970). Los diferentes "modelos" que se proponen son esquemas que justifican el pasaje de cationes "sobrentendiendo" la dificultad de un mecanismo activo de pasajes de aniones, específicamente de Cl^-.

Las diferencias también son cuantitativas; en el Cuadro 1 se comparan los resultados obtenidos en la piel *in vivo* de dos especies que han sido estudiadas por nosotros con algunos de los datos *in vitro*; de los últimos, con el objeto de que las cifras sean comparables, hemos escogido aquellos en los que el lado mucoso de la piel estuvo en contacto con bajas concentraciones de Na^+ (1 — 10 mM).

CUADRO 1. Comparación de los flujos netos de Na^+ (fn Na^+) a través de la piel *in vivo* e *in vitro* de *Leptodactylus ocellatus* y *Calyptocephalella caudiverbera*. Datos en μEq/hr x cm² ± ESM.

Especie	N	fn Na^+	Referencias bibliográficas
L. ocellatus:			
in vivo *	8	0.018 ± 0.007	Este trabajo, Cuadro 5.
in vitro	9	0.50 ± 0.07	ROTUNNO y CEREIJIDO, 1966.
C. caudiverbera			
in vivo *	7	0.022 ± 0.004	Este trabajo, Cuadro 8.
in vitro	—	0.09	CARLISKY, 1970 .ª

* Re-calculados con el auxilio de las ecuaciones del Cuadro 4; N: número de experimentos; a: el autor no indica el número de mediciones ni su error standard.

Varias son las razones que podríamos argüir para justificar discrepancias como las que acabamos de comentar e ilustrar. En general, diremos que las condiciones *in vitro* constituyen un sistema en sí mismas, con sus propias variables, que no necesariamente corresponden a las situaciones de los animales intactos. Recordaremos que prácticamente todos los datos *in vitro* se obtuvieron poniendo el lado externo de la piel aislada en contacto con soluciones Ringer cuyas composiciones casi nunca corresponden a las que los animales están sometidos en su habitat natural. Dichas soluciones son isotónicas con respecto al medio interno; en cambio, los anfibios no están en contacto con soluciones cuya concentración de Na^+, por ejemplo, sea superior a los 5—10 mM, siempre hipo-osmóticas con respecto a su medio interno [5]. Más aún, confirmando el comentario anterior están algunas de las críticas al modelo de USSING que surgen del hecho de que dicho esquema de transporte de Na^+ a través de la piel aislada no se cumple cuando su concentración en el Ringer utilizado es menor de 10 mM (CEREIJIDO, HERRERA, FLANIGAN, y CURRAN, 1964). Otro tanto ocurre con el Cl^- (MARTIN, *op. cit.*; MARTIN y CURRAN, *op. cit.*). CEREIJIDO, REISIN y ROTUNNO (1968) demostraron que las modificaciones en la concentración de Na^+ externo van acompañadas de cambios en la concentración de Na^+ del epitelio de *Leptodactylus ocellatus*; en la misma especie, también se ha visto que la magnitud del flujo neto de Cl^- *in vitro* es dependiente de su concentración externa a partir de los 60 mM (FISCHBARG, ZADUNAISKY y DE FISCH, 1967).

Además, en 1966, BIBER, CHEZ y CURRAN vieron que los influjos de Na^+ a través de la piel aislada de *Rana pipiens* cuyo lado mucoso está bañado con solución de NaCl

[5] Se conocen unas pocas excepciones (*Rana cancrivora* y *Bufo viridis*, por ejemplo) que viven en contacto con agua de mar.

1 mM, varían significativamente según la condición bajo la cual se hacen las mediciones (0.40 y 0.08 µM/hr x cm^2 en "corto circuito" y en "circuito abierto", respectivamente).

Por otra parte, se ha llamado la atención acerca de los artefactos que se provocan en las preparaciones de piel de anfibios *in vitro* debido a daños mecánicos (DOBSON y KIDDER, 1968; HELMAN y MILLER, 1971) o a la diferente velocidad de difusión de los isótopos radiactivos a través del *corium* (HOSHIKO, LINDLEY y EDWARDS, 1964). Recientemente VOÛTE y USSING (1968) mostraron que la ultraestructura de la piel aislada de *R. temporaria* se modifica irreversiblemente según esté o no bajo condiciones de corto circuito.

NUTBOURNE (1968) mostró que el transporte de Na^+ y las propiedades eléctricas de la piel son afectadas por pequeños gradientes de presión hidrostática que puedan existir a ambos lados del epitelio aislado de la misma *R. temporaria* o por el pandeo de la piel; sabemos que dichas variables son muy difíciles de controlar.

La piel aislada es una preparación en la cual el epitelio en estudio está denervado y carente de los aportes provenientes de su sistema circulatorio; se sabe que dichos factores no son despreciables y que afectan significativamente la permeabilidad iónica de la piel aislada de los anfibios (GONZÁLEZ, SÁNCHEZ y CONCHA, 1967, 1969; SALÉE y VINDREQUIN-DELIÈGE, 1967; SCHOFFENIELS y SALÉE, 1965).

No es justo ignorar aquéllos trabajos que a pesar de utilizar técnicas *in vivo*, someten a los animales a condiciones experimentales que son tanto o más "anti-fisiológicas" como las que separan la piel y la montan entre dos cámaras de plástico o vidrio y lleno de Ringer. En este sentido, debemos mencionar que excepción hecha de los clásicos experimentos de KROGH (ver KROGH, 1939) —y ahora los nuestros— los datos de flujos iónicos que provienen de experimentos con la piel *in situ* también merecen cierto reparo ya que se trata de animales demedulados (TORELLI, CELENTANO, CORTILI y GUELLA, 1968), anestesiados con pentobarbital (BROWN, 1962), etc. y sin haber controlado adecuadamente el efecto de estos tratamientos sobre las propiedades de transporte iónico del epitelio.

Todo lo que antecede no significa renegar definitivamente de las técnicas *in vitro;* más bien implica una llamada de atención para subrayar la necesidad de estar comparando crítica y permanentemente sus resultados con aquéllos obtenidos sobre el animal entero.

Diremos, en resumen, que la información proveniente de las técnicas *in vitro* o *in vivo* debe *a*) ser integrada adecuadamente en el correcto contexto (fisicoquímico, fisiológico, ecológico, etc.) en el que la naturaleza abriga en la actualidad a los anfibios, y *b*) que toda extrapolación a situaciones experimentales más complejas debe ser cuidadosamente evaluada.

En las páginas que siguen nos ocuparemos, principalmente, de los mecanismos de captación de Cl^- y de Na^+ a través de la piel *in vivo* de tres especies de anfibios sudamericanos: *Leptodactylus ocellatus* (L.), *Calyptocephalella caudiverbera* (L.) y *Bufo arunco* (LESSON). Adicionalmente, en el caso de *C. caudiverbera,* hemos incursionado en el estudio del efecto de las hormonas neurohipofisarias sobre esos mecanismos de transporte iónico. Trataremos de contestar algunas preguntas básicas: ¿cómo penetran el Cl^- y el Na^+?, ¿cuáles son los iones endógenos intercambiados por los externos?, ¿de qué manera afectan los cambios externos a los mecanismos de pasaje de iones?, ¿cuál es la regulación endocrina de dichos mecanismos? Cuando sea posible, compararemos nuestros resultados con la información disponible de experimentos realizados sobre los mismos epitelios *in vitro.*

El conocimiento de la regulación electrolítica de las especies arriba mencionadas ofrece un interés especial ya que su secuencia de hábito (acuático, semi-acuático y terrestre) permite conocer, comparativamente, algunos aspectos de la fisiología hidromineral de los anfibios y, por extensión, de los vertebrados acuáticos.

El estudio de los mecanismos de captación de iones a través de la piel de anfibios posee, además, un valor potencial para el entendimiento de procesos cualitativamente similares a los que se observan en otros epitelios como, por ejemplo, el del túbulo distal del nefrón de mamífero (DICKER, 1970); en este sentido, otras disciplinas, como la farmacología, pueden ser enriquecidas con la información brindada por estudios como el presente.

Segunda Parte

TRANSPORTE DE Cl^- Y DE NA^+ A TRAVES DE LA PIEL *IN SITU* DE *LEPTODACTYLUS OCELLATUS, BUFO* Y *CALYPTOCEPHALELLA CAUDIVERBERA.*

Capítulo I. *Disociación e inhibición selectiva de los flujos iónicos netos.*

1. Introducción. Algunos antecedentes bibliográficos.

Largo sería enumerar los antecedentes bibliográficos que se ocupan específicamente de los mecanismos de transporte iónico a través de la piel del leptodactílido *Leptodactylus ocellatus.* Entre los aportes modernos quisiéramos destacar los valiosos trabajos producidos en el laboratorio del Dr. MARCELINO CEREIJIDO, en Buenos Aires (CEREIJIDO y ROTUNNO, 1970; CEREIJIDO, MORENO, REISIN, RODRÍGUEZ, ROTUNNO y ZYLBER, 1973; MORENO, REISIN, RODRÍGUEZ, ROTUNNO y CEREIJIDO, 1973), quien desde hace varios años está estudiando sus mecanismos de captación de Na^+ *in vitro. L. ocellatus* es una especie de hábitos semi-acuáticos y una de las pocas en las que se ha descrito un transporte activo de Cl^- a través de la piel aislada (ZADUNAISKY, CANDIA y CHIARANDINI, 1963).

Con referencia al bufónido *Bufo arunco,* debemos mencionar de manera especial los aportes del grupo de la Universidad de Concepción que se ha ocupado del efecto de diversos mediadores de la conducción nerviosa sobre las propiedades eléctricas de la piel en relación al transporte de Na^+ *in vitro* (GONZÁLEZ, SÁNCHEZ y CONCHA, 1966, 1967, 1969; NORRIS, CONCHA, GONZÁLEZ y SÁNCHEZ, 1972; SÁNCHEZ, GONZÁLEZ y CONCHA, 1966).

Calyptocephalella caudiverbera es también un leptodactílido, especie y género endémicos de Chile, que en estado adulto es de hábito acuático (CARLISKY, CEREIJIDO, BARRIO y MIGLIORA, 1970; CEI, 1962). CASAMIQUELA (1963) ha comunicado el hallazgo de *Gigantobatrachus parodii,* anuro fósil del Mioceno de la Patagonia argentina, cuya morfología es, salvo la talla, casi idéntica a la de *C. caudiverbera.* La denominación sistemática de la "rana chilena" fue recientemente modificada por DONOSO - BARROS (1970) [6]; la nomenclatura anterior era *Calyptocephalella gayi.* La única información que pudimos conocer referente al transporte de iones a través de la piel de *C. caudiverbera* se encuentra en los trabajos de CARLISKY (1970) y de CARLISKY, CEREIJIDO, BARRIO y MIGLIORA (*op. cit.*).

Los experimentos que se presentan a continuación procuran contestar uno de los interrogantes que nos planteamos en la Introducción General; ¿cómo penetran el Cl^- y el Na^+ a través de la piel de estas especies? Veremos que bajo ciertas condiciones experimentales es posible demostrar que los flujos iónicos netos de Cl^- y Na^+ a través de la piel *in vivo* son independientes, disociables.

Además, en el caso de *C. caudiverbera* se verá que la captación de dichos iones se hace por intercambio con HCO_3^- e H^+ endógenos respectivamente.

En lo que sigue denominaremos, siguiendo la nomenclatura vulgar, como "ranas" a *L. ocellatus* y *C. caudiverbera,* a pesar de no pertenecer al género *Rana*; asimismo, nos referiremos a *B. arunco* como "sapo".

2. Material y métodos.

— *Origen y mantenimiento de los animales. Leptodactylus ocellatus* fue capturado en la provincia de Buenos Aires, Argentina, en los alrededores de la ciudad de La Plata. Los ejemplares de *Calyptocephalella caudiverbera* y de *Bufo arunco* provinieron de la zona central de Chile. En casi todos los casos, una vez llegados al laboratorio, los animales fueron colocados en recipientes con agua potable; en ciertos casos, fueron mantenidos en piscinas, al aire libre. La cantidad de agua a la que tenían acceso era regulada de acuerdo con sus hábitos.

Los animales permanecieron en estas condiciones por períodos variables (desde pocos días hasta 8 semanas, aproximadamente); eran alimentados por la fuerza con

---

[6] Poco después, LYNCH (1971) publicó un extenso trabajo crítico acerca de los leptodactílidos en el cual discute, entre otras cosas, su ubicación sistemática.

trozos de diversas vísceras de vacuno, porcino, u ovino. A veces fueron alimentados con renacuajos de *C. caudiverbera* o con pequeños *Pleurodema;* en este último caso la alimentación es espontánea.

En todos los experimentos se utilizaron ejemplares adultos, sin considerar su sexo. Los animales con heridas en la piel, con signos de alguna infección o que no aparentaban estar en buenas condiciones de salud, fueron, según el caso, aislados hasta su mejoría o sacrificados. Tampoco fueron utilizados aquéllos animales que en el momento del experimento estaban mudando. El rango de peso de los animales usados, en gramos ± error estandard de la media (ESM), figura en los diferentes Cuadros. "N" significa, en todos los casos, número de mediciones o experimentos.

— *Pre-adaptación de los animales.* Con anterioridad a la medida de los flujos iónicos, los animales fueron mantenidos en pequeños recipientes por períodos que oscilaron, según el protocolo experimental, entre 2 y 4 semanas, en alguna de las soluciones cuyos detalles de concentración se dan en el Cuadro 2; el pH de las soluciones osciló alrededor de 6.4 y el del agua potable fue de 7.7 — 7.9.

Los animales pre-adaptados en soluciones de NaCl fueron considerados como controles; en el Cuadro 3 se muestra que la cloremia y la natremia de *C. caudiverbera* no es diferente de la de las ranas mantenidas en agua potable; el hematocrito promedio de los animales pre-adaptados en agua potable fue de 29.8%, mientras que el de los mantenidos en NaCl 3.4 mEq/l fue 26.0%. La pre-adaptación en Na_2SO_4 se hizo con el propósito de exaltar los mecanismos de transporte de Cl^-; inversamente, la pre-adaptación en Cl-colina o en NH_4Cl se hizo con el objeto de exaltar los mecanismos de transporte de Na^+.

CUADRO 2. Concentraciones de las soluciones de pre-adaptación.

Solución	Concentración (mEq/l)
NaCl	0.4
NaCl	1.7
NaCl	3.4
Na_2SO_4	3.4
Cl-colina	3.4
NH_4Cl	0.4
Agua potable	2.0 — 4.0

CUADRO 3. Concentraciones de Cl^- y de Na^+ en el suero de *Calyptocephalella caudiverbera*, pre-adaptada en agua potable y en soluciones de NaCl. Datos en mEq/l ± ESM.

Pre-adaptación	N	Cloremia	Natremia
Agua potable	6	69.9 ± 2.3	105.6 ± 2.4
NaCl 1.7 mEq/l	5	72.3 ± 0.6	106.3 ± 1.8
NaCl 3.4 mEq/l	6	72.1 ± 1.4	106.1 ± 1.9

En general se acepta que el $SO_4^=$ no penetra la epidermis de anfibios (ALVARADO y MOODY, 1970; DIETZ, KIRSCHNER y PORTER, 1967); en el caso particular de la piel *in situ* de *C. caudiverbera* ciertos experimentos preliminares (A. SALIBIÁN y C. MATAMALA, inédito) nos permiten afirmar que dicho ion no la penetra. Asimismo, la colina es un catión que también se considera impermeante en la piel de anfibios (KIRSCHNER, 1960), aunque puede afectar el influjo de Na^+ a través de la piel aislada de *Rana pipiens* (MACEY y KOBLICK, 1963).

La pre-adaptación en agua destilada y deionizada se efectuó con la intención de depletar los animales de Cl^- y de Na^+.

El período de pre-adaptación transcurrió siempre en el laboratorio; en verano a la temperatura ambiente y en invierno a 18 — 20 °C (estufas). La alimentación era generalmente suspendida una semana antes de los experimentos.

Todas las especies utilizadas soportaron fácilmente la pre-adaptación en las soluciones de NaCl, agua de llave, agua deionizada y Na_2SO_4. El Cl-colina provocó una desusada

mortalidad en las tres especies; *L. ocellatus* toleró bien la pre-adaptación en soluciones diluídas (0.4 mEq/l) de NH_4Cl. La adaptación de *C. caudiverbera* al resto de las soluciones fue excelente; hemos tenido algunos ejemplares que estuvieron sumergidos en ellas por espacio de 60-75 días sin aparentes molestias.

— *Canulación.* 36 - 48 horas previas al experimento, los animales fueron pesados. Luego su cloaca fue canulada con un tubo de plástico que fue fijado por medio de una ligadura subepitelial concéntrica. De esa forma, la orina era recogida fuera del baño externo, con lo cual quedaba asegurado de que la piel era la única responsable de los cambios detectados; además, esta preparación permite evaluar el volumen de orina excretado durante los experimentos. Siendo que las soluciones externas casi siempre fueron más diluídas que la orina, el análisis químico del baño externo permite también descubrir posibles pérdidas de orina por fisuras de la cánula o de la piel afectada por la sutura.

Una vez canulados los animales, fueron colocados en frascos individuales en contacto con la misma solución de pre-adaptación. Así fueron mantenidos hasta el momento del experimento, renovando dos veces por día la solución en la que estaban sumergidos, por sifón, evitando toda perturbación de los animales. Todas las especies toleraron la cánula por espacio de 3-5 días; después de dicho lapso empezaba un proceso necrótico, casi siempre reversible. Después de la descanulación, la piel alrededor de la cloaca cicatriza rápidamente.

— *Medida de los flujos iónicos netos.* El día del experimento, se reemplazó la solución de pre-adaptación externa por la que sería utilizada en la medida de los parámetros que interesaban (pH, conductividad, Cl^-, Na^+, etc.). El volumen de la nueva solución, que fue cuidadosamente medido, era generalmente el suficiente para cubrir la mayor parte del cuerpo; la relación peso corporal/volumen del baño externo era de aproximadamente 1/3 o 1/4.

El sistema (Figura 5) se dejaba estabilizar durante unos 20-30 minutos, momento en el que se tomaba la primera muestra del baño externo (5-12 ml), mediante una pipeta o jeringa. Posteriormente, se continuaba tomando muestras cada 30-60 minutos, durante lapsos que oscilaban entre 1.5 y 6 horas, aproximadamente.

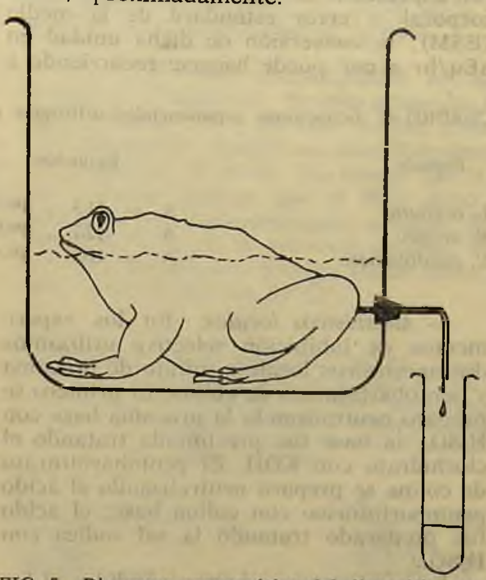


FIG. 5. Diagrama esquemático del dispositivo experimental para medir flujos netos a través de la piel intacta.

En los pocos experimentos en los que interesaba conocer simultáneamente la evolución de la conductividad del medio, se introdujo la correspondiente celda a un costado del recipiente, de manera que se evitara cualquier perturbación del animal.

La concentración de los iones considerados en el baño externo (o de su conductividad) fue graficada contra el tiempo y los flujos (netos) fueron calculados a partir de las pendientes de las respectivas rectas de regresión. Para estos cálculos, se consideró como volumen del baño externo, un valor promedio durante el experimento (GARCÍA ROMEU y MAETZ, 1964; MAETZ, 1956). Sólo se tomaron en cuenta aquellos experimentos en los cuales los flujos netos fueron positivos, esto es, en los cuales había entrada neta de iones. Por convención, los flujos son "positivos" y se expresan precedidos del signo "+" cuando la concentración del ion en la solución externa disminuye, absorbiéndolo a través de su piel; inversamente, el aumento de la concentración de una especie química en la solución externa (flujo neto negativo) se indica con el signo "—".

Los datos de flujos iónicos siempre fueron expresados en μEq/hr x 100 gr de peso corporal ± error estandard de la media (ESM); la conversión de dicha unidad en μEq/hr x cm^2 puede hacerse recurriendo a las fórmulas del Cuadro 4. La conductividad se expresó en μEq/l de NaCl multiplicando sus unidades (ohm^{-1}. cm^{-1}) por un factor experimentalmente determinado (8.662).

CUADRO 4. Ecuaciones exponenciales utilizadas para relacionar el peso (P) con el área (A) corporal.

Especie	Ecuación	Referencias bibliográficas
L. ocellatus	$A = 11.3 \cdot P^{0.58}$	HUTCHISON, WHITFORD y KOHL, 1968.
B. arunco	$A = 12.7 \cdot P^{0.57}$	ESPINA y ROJAS, 1972.
C. caudiverbera	$A = 10.8 \cdot P^{0.63}$	ESPINA y ROJAS, 1972.

— *Anestésicos locales.* En los experimentos de inhibición selectiva utilizamos dos anestésicos locales: sulfato de procaína y pentobarbiturato de colina. El primero se preparó neutralizando la procaína base con H_2SO_4; la base fue precipitada tratando el clorhidrato con KOH. El pentobarbiturato de colina se preparó neutralizando el ácido pentobarbitúrico con colina base; el ácido fue preparado tratando la sal sódica con H_2SO_4.

Estos anestésicos fueron añadidos al baño externo en cantidad suficiente para lograr una concentración final de 2 mM; el volumen necesario para ello fue despreciable con respecto al de la solución externa en la que los animales estaban sumergidos (0.8 — 1.2 ml).

— *Métodos analíticos.* Todas las mediciones se efectuaron por duplicado.

Sodio. Por fotometría de emisión (fotómetros YOBIN-IVON y EPPENDORF) o por espectrofotometría de absorción atómica (PERKIN ELMER, modelo 290).

Cloro. Por potenciometría de acuerdo a la técnica de SANDERSON (1952).

Conductividad. En un conductímetro PHILLIPS PR 9500.

Estadística. Nuestro nivel de "diferencia significativa" fue $p \leq 0.05$; la comparación entre grupos se hizo recurriendo al *test* de Student; dejamos constancia del valor de *t* sólo en los casos en que las diferencias detectadas eran significativas.

3. Resultados.

I. Disociación de los flujos iónicos netos.

A. *Leptodactylus ocellatus.* Los experimentos se efectuaron sobre animales preadaptados en diferentes soluciones de 0.4 mEq/l; los flujos netos fueron medidos a partir de soluciones de NaCl 0.9 mEq/l. En el Cuadro 5 se presentan los resultados .

CUADRO 5. Flujos netos (fn) de Cl^- y de Na^+ a través de la piel *in situ* de *Leptodactylus ocellatus*, pre-adaptada en diferentes soluciones y sumergida en solución de NaCl 0.9 mEq/l (μEq/hr x 100 gr ± ESM).

Solución de pre-adaptación	*N*	*Peso corporal (gr.)*	*fn* Cl^-	*fn* Na^+	*Diferencias**
NaCl	8	74.9 ± 9.5	+ 5.9 ± 1.2	+ 2.5 ± 1.0	+ 3.4 ± 1.4[a]
Na_2SO_4	6	58.0 ± 4.3	+ 9.5 ± 0.9	+ 1.9 ± 1.2	+ 7.6 ± 1.1[b]
Cl—colina	3	94.0 ± 26.2	+ 6.2 ± 1.6	+ 8.4 ± 2.2	— 2.2 ± 0.9
NH_4Cl	7	78.5 ± 7.3	+ 5.9 ± 1.9	+ 6.2 ± 1.7	— 0.3 ± 0.5

*) Diferencias medias de datos pareados (fn Cl^- — fn Na^+ ± ESM)

a: $p < 0.025$ ($t = 2.66$).
b: $p < 0.005$ ($t = 7.10$).

A—1. Animales pre-adaptados en NaCl (Grupo control). Los flujos netos resultan estadísticamente diferentes; la misma tendencia se verá en el caso de las otras dos especies.

A—2. Animales pre-adaptados en Na_2SO_4. La captación de Cl^- fue significativamente mayor (cinco veces) que la de Na^+. La Figura 6 ilustra un típico experimento en el que puede visualizarse la independencia de ambos flujos.

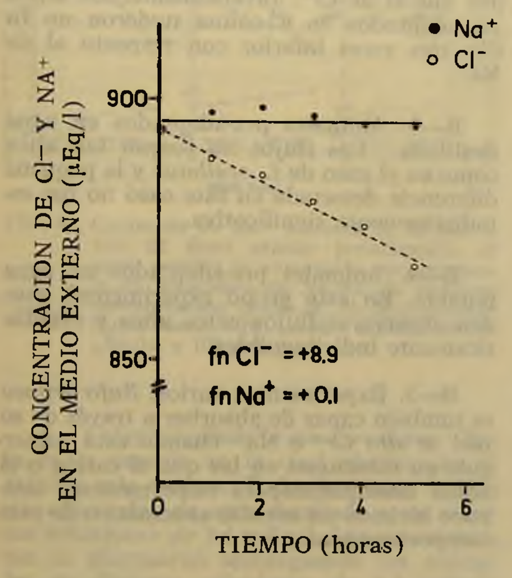


FIG. 6. Captación de Cl— y de Na+ a través de la piel *in situ de Leptodactylus ocellatus* pre-adaptada en Na_2SO_4 y sumergida en solución de NaCl (Rana Nº 12). Los flujos netos (fn) están expresados en µEq/hr x 100 gr.

A—3. Animales pre-adaptados en Cl-colina y en NH_4Cl. Como era de esperar, en las ranas pre-adaptadas en Cl-colina los flujos de Na^+ fueron mayores que los de Cl^-. Las diferencias detectadas no fueron estadísticamente significativas posiblemente debido al escaso número de mediciones. Los flujos de Cl^- y de Na^+ de animales pre-adaptados en NH_4Cl fueron prácticamente iguales y no se detectó aquella tendencia observada en el grupo Cl-colina (fn Na^+ > fn Cl^-). Llama la atención que los fnCl^- tanto en las ranas del grupo control como en las de estos dos grupos sean prácticamente iguales.

A—4. Animales pre-adaptados en agua destilada (Cuadro 6). En este grupo los flujos netos de Cl^- y de Na^+ fueron altos y sus diferencias resultaron estadísticamente significativas: el fn Cl^- fue mayor que el fn Na^+. Puede notarse que el flujo neto de NaCl, medido indirectamente, a través de la conductividad de la solución externa, está en estrecha relación con los flujos netos de Na^+ pero no con los de Cl^-.

CUADRO 6. Flujos netos (fn) de Cl—, Na+ y NaCl a través de la piel *in situ* de *Leptodactylus ocellatus* pre-adaptada en agua destilada y sumergida en solución de NaCl 0.8 mEq/l (µEq/hr. x 100 gr. ± ESM).

N		4		
Peso corporal (gr)		71.3	±	4.0
fn Cl—	+	18.2	±	7.3
fn Na+	+	12.2	±	6.6
fn Na*Cl	+	12.9	±	7.2
Diferencias**:				
fn Cl— — fn Na+	+	6.0	±	1.5ᵃ
fn Cl— — fn NaCl	+	5.3	±	0.6ᵇ
fn Na+ — fn NaCl	—	0.7	±	1.3

*) Medido a partir de la conductividad de la solución externa.
**) Diferencias medias de datos pareados ± ESM

a: $p < 0.01$ ($t = 4.08$).
a: $p < 0.001$ ($t = 9.30$).

A—5. Experimentos varios. En solamente dos casos medimos los flujos de Cl^- y de Na^+ en ranas pre-adaptadas en agua de llave y sumergidas en solución de NaCl 0.8 mEq/l. Los flujos netos de Cl^- fueron + 12.6 y + 7.5, y los de Na^+ fueron + 2.7 y + 0.8 µEq/hr x 100 gr, respectivamente. Asimismo, pudimos comprobar, en otros dos experimentos, que *L. ocellatus* pre-adaptado en Na_2SO_4 0.8 mEq/l es capaz de absorber Cl^- cuando es sumergido en una solución en la que el catión es impermeante (Cl-colina 0.8 mEq/l). Los fnCl^- fueron + 13.2 y + 5.2 y los de Na^+ fueron + 0.9 y + 0.2 µEq/hr x 100 gr, respectivamente. La Figura 7 ilustra uno de los casos mencionados.

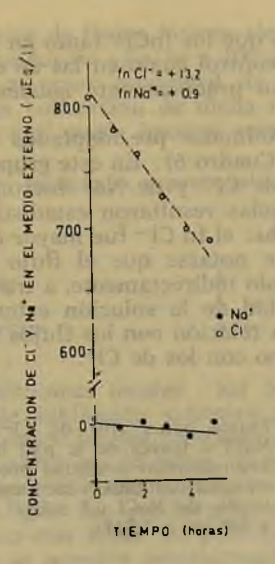


FIG. 7. Captación neta de Cl— a través de la piel *in situ* de *Leptodactylus ocellatus* pre-adaptada en Na_2SO_4 y sumergida en solución de Cl—colina (Rana Nº 40; 57,6 gr.). Los flujos netos (fn) están expresados en µEq/hr x 100 gr.

B. *Bufo arunco.* Los sapos fueron pre-adaptados en diferentes soluciones de 1.7 mEq/l y los flujos netos fueron medidos sumergiéndolos en soluciones de NaCl de la misma concentración. Los resultados están en el Cuadro 7.

B—1. Animales pre-adaptados en NaCl. Los flujos netos no fueron significativamente diferentes a pesar de que la tendencia fue, igual que en *L. ocellatus,* en el sentido de los flujos netos de Cl^- mayores que los de Na^+.

B—2. Animales pre-adaptados en Na_2SO_4 y en Cl-colina. Tal como en *L. ocellatus,* estos dos grupos demostraron una disociación significativa de sus flujos iónicos netos. En el caso de los sapos pre-adaptados en Na_2SO_4 el flujo neto de Na^+ fue unas 10 veces menor que el de Cl^-. Inversamente, los sapos pre-adaptados en Cl-colina tuvieron un fn Cl^- tres veces inferior con respecto al de Na^+.

B—3. Animales pre-adaptados en agua destilada. Los flujos no fueron tan altos como en el caso de *L. ocellatus* y la pequeña diferencia detectada en este caso no fue estadísticamente significativa.

B—4. Animales pre-adaptados en agua potable. En este grupo experimental, pueden observarse flujos netos altos y estadísticamente indistinguibles.

B—5. Experimentos varios. *Bufo arunco* es también capaz de absorber a través de su piel *in situ* Cl^- o Na^+ cuando está sumergido en soluciones en las que el catión o el anión acompañante es impermeante; tampoco hicimos un estudio sistemático de este comportamiento.

CUADRO 7. Flujos netos (fn) de Cl— y de Na+ a través de la piel *in situ* de *Bufo arunco* pre-adaptado en diferentes soluciones y sumergido en solución de NaCl 1.7 mEq/l (µEq/hr. x 100 gr ± ESM).

Solución de pre-adaptación	*N*	Peso corporal (gr.)	fn Cl—	fn Na+	Diferencias*
NaCl	7	67.9 ± 7.7	+ 14.0 ± 3.0	+ 10.0 ± 1.6	+ 4.0 ± 2.0
Agua potable	9	53.0 ± 7.2	+ 16.8 ± 2.9	+ 17.7 ± 2.1	— 0.9 ± 1.4
Agua destilada	7	88.9 ± 8.7	+ 11.5 ± 3.9	+ 12.2 ± 4.9	— 0.7 ± 1.2
Cl—colina	5	56.8 ± 1.6	+ 8.4 ± 3.1	+ 26.6 ± 5.1	—18.2 ± 3.3[a]
Na_2SO_4	7	66.6 ± 6.3	+ 9.2 ± 1.3	— 1.1 ± 1.3	+10.3 ± 1.2[b]

*) Diferencias medias de datos pareados (fn Cl— — fn Na+ ± ESM).

a: $p < 0.01$ ($t = 5.54$). b: $p < 0.001$ ($t = 9.85$).

La Figura 8 ilustra un típico experimento en el que *B. arunco* pre-adaptado en agua potable es capaz de captar Na^+ cuando está sumergido en soluciones de Na_2SO_4 de diferentes concentraciones. Nótese la dependencia de la magnitud del fn Na^+ con su concentración en el baño externo.

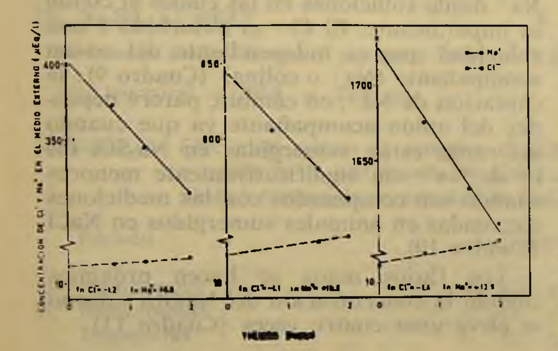


FIG. 8. Captación de Na+ a través de la piel *in situ* de *Bufo arunco* pre-adaptado en agua potable y sumergido sucesivamente en soluciones de Na_2SO_4 de diferente concentración (Sapo N° 54; 81.0 gr). Los flujos netos (fn) están expresados en μEq/hr x 100 gr.

C. *Calyptocephalella caudiverbera.* Esta es la especie en la cual efectuamos el estudio más extenso. Todas las ranas fueron pre-adaptadas en agua destilada o en diversas soluciones de 3.4 mEq/l. Los experimentos se efectuaron sumergiendo los animales en diversas soluciones de 1.7 mEq/l. Los resultados están enlistados en el Cuadro 8.

C—1. Animales pre-adaptados en NaCl. En el caso de *C. caudiverbera* también se observa una disociación de los flujos de Cl^- y de Na^+ siendo el fn Cl^- significativamente mayor que el fn Na^+; en este caso no cabe ninguna duda de que la diferencia es real debido al elevado número de mediciones efectuadas. Cuando los animales son pre-adaptados en soluciones más diluídas (0.4 mEq/l) los flujos son notoriamente mayores (primera línea del Cuadro 8).

C—2. Animales pre-adaptados en Cl-colina y en Na_2SO_4. La disociación de flujos netos observados en *L. ocellatus* y en *B. arunco* existe también en esta especie; las

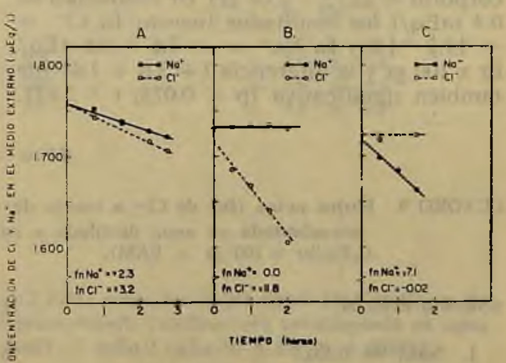


FIG. 9. Captación de Cl— y de Na+ a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* pre-adaptada en soluciones de NaCl (A), Na_2SO_4 (B) y Cl—colina (C) y sumergidas en soluciones de NaCl (Ranas Nos. 144, 21 y 93, de 204, 155 y 154 gr, respectivamente). Los flujos netos (fn) están expresados en μEq/hr x 100 gr.

CUADRO 8. Flujos netos (fn) de Cl— y de Na+ a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* pre-adaptada en diferentes soluciones y sumergida en solución de NaCl 1.7 mEq/l (μEq/hr x 100 gr. ± ESM).

Solución de pre-adaptación	N	Peso corporal (gr.)	fn Cl—	fn Na+	Diferencias*
NaCl 0.4 mEq/l	7	278.9 ± 41.1	+ 11.1 ± 2.1	+ 8.1 ± 1.4	+ 3.0 ± 2.4
NaCl 3.4 mEq/l	40	205.9 ± 16.2	+ 7.8 ± 0.8	+ 5.5 ± 0.6	+ 2.3 ± 0.9[a]
Agua destilada	21	211.2 ± 13.1	+ 11.7 ± 1.3	+ 7.2 ± 1.1	+ 4.5 ± 1.7[b]
Cl—colina	41	188.0 ± 14.0	+ 6.0 ± 0.8	+ 8.5 ± 0.8	— 2.5 ± 1.1[c]
Na_2SO_4	24	231.5 ± 22.0	+ 19.7 ± 3.0	+ 6.5 ± 0.9	+13.2 ± 3.1[d]

*) Diferencias medias de datos pareados (fn Cl— — fn Na+ ± ESM).

a: $p < 0.025$ ($t = 2.33$)
b: $p < 0.025$ ($t = 2.68$)
c: $p < 0.05$ ($t = 2.15$)
d: $p < 0.001$ ($t = 4.20$)

diferencias observadas entre ambos flujos netos también son mucho mayores en el caso de las ranas pre-adaptadas en Na_2SO_4 3.4 mEq/l. En la Figura 9 se ilustran tres típicos experimentos.

C—3. Animales pre-adaptados en agua destilada. Los flujos netos de Cl^- y de Na^+ fueron mayores que en el grupo control o pre-adaptado en NaCl 3.4 mEq/l; sin embargo, la diferencia entre dichos flujos netos fue estadísticamente significativa. En otro grupo de ranas pre-adaptado por el mismo tiempo en agua destilada (N = 20), pero cuyos flujos de Cl^- y de Na^+ fueron medidos sumergiendo los animales (peso corporal = 225.5 ± 23.0 gr) en soluciones de 0.4 mEq/l los resultados fueron: fn Cl^- = + 11.2 ±1.0 y fn Na^+ = + 7.6 ± 0.6 μEq/hr x 100 gr y la diferencia (+ 3.6 + 1.4) fue también significativa ($p < 0.025$; t ± 2.62).

Llama la atención nuestra que los flujos iónicos netos son prácticamente idénticos a los del grupo incluido en la tercera línea del Cuadro 8.

C—4. Experimentos varios. *C. caudiverbera* es también capaz de absorber Cl^- y Na^+ desde soluciones en las cuales el co-ión es impermeante. El Cl^- es absorbido a una velocidad que es independiente del co-ión acompañante (Na^+ o colina) (Cuadro 9); la captación de Na^+, en cambio, parece depender del anión acompañante ya que cuando las ranas están sumergidas en Na_2SO_4 los fn de Na^+ son significativamente menores cuando son comparados con las mediciones efectuadas en animales sumergidos en NaCl (Cuadro 10).

Los flujos netos se hacen próximos cuando la concentración del Na_2SO_4 externo se eleva unas cuatro veces (Cuadro 11).

CUADRO 9. Flujos netos (fn) de Cl— a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* pre-adaptada en agua destilada y sumergida sucesivamente en diferentes soluciones (μEq/hr x 100 gr ± ESM).

Solución externa	N	fn Cl—	Diferencia *
I. NaCl 0.4 mEq/l	6	+ 10.1 ± 1.8	+ 0.2 ± 0.9
II. Cl—colina 0.4 mEq/l		+ 9.9 ± 2.3	

* Diferencia media de datos pareados (I - II ± ESM).

Peso corporal = 162.3 ± 9.5 gr.

CUADRO 10. Flujos netos (fn) de Na+ a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* pre-adaptada en agua destilada y sumergida sucesivamente en diferentes soluciones (μEq/hr x 100 gr ± ESM).

Solución externa	N	fn Na+	Diferencia *
I. NaCl 0.4 mEq/l	6	+ 7.2 ± 1.6	+ 4.7 ± 1.1ª
II. Na_2SO_4 0.4 mEq/l	6	+ 2.5 ± 1.1	

* Diferencia media de datos pareados (I - II ± ESM).

a: $p < 0.005$ (t = 4.40)

Peso corporal = 162.3 ± 9.5 gr.

CUADRO 11. Flujos netos (fn) de Na^+ a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* pre-adaptada en agua destilada y sumergida sucesivamente en diferentes soluciones (μEq/hr x 100 gr ± ESM).

Solución externa	N	fn Na^+	Diferencia *
I. NaCl 0.4 mEq/l	4	+ 6.2 ± 2.2	— 2.7 ± 1.1
II. Na_2SO_4 1.7 mEq/l	4	+ 8.8 ± 3.4	

* Diferencia media de datos pareados (I–II ± ESM).

Peso corporal = 200.8 ± 27.8 gr.

CUADRO 12. Efecto del *sulfato de procaína* (2 mM) sobre los flujos netos (fn) de Cl^- y de Na^+ a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* pre-adaptada en agua destilada y sumergida en solución de NaCl 0.4 mEq/l (μEq/hr x 100 gr ± ESM).

Período	fn Cl^-	fn Na^+
I. Pre-procaína	+ 9.5 ± 1.9	+ 4.4 ± 1.4
II. Post-procaína	+ 8.4 ± 0.6	— 5.5 ± 1.3
Diferencias *	+ 1.1 ± 0.9	+ 9.9 ± 1.3[a]

* Diferencias medias de datos pareados (I - II ± ESM).
a: $p < 0.01$ ($t = 7.50$).

Peso corporal = 272.0 ± 85.3 gr . (N = 4).

CUADRO 13. Efecto del *pentobarbiturato de colina* (2 mM) sobre los flujos netos (fn) de Cl^- y de Na^+ a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* pre-adaptada en agua destilada y sumergida en solución de NaCl 1.7 mEq/l (μEq/hr x 100 gr ± ESM).

Período	fn Cl^-	fn Na^+
I. Pre-pentobarbital	+ 9.2 ± 1.0	+ 8.0 ± 0.7
II. Post-pentobarbital	+ 1.4 ± 0.5	+ 8.9 ± 0.9
Diferencias *	+ 7.8 ± 1.3[a]	— 0.9 ± 1.0

* Diferencias medias de datos pareados (I - II ± ESM).
a: $p < 0.001$ ($t = 6.14$).
Peso corporal = 185.8 ± 24.1 gr (N = 8).

Esta dependencia de los fn Na^+ con respecto a su concentración en el baño externo, también señalada para *Bufo arunco*, se ilustra en la Figura 10; en la Figura 11 se ve ilustrado un caso de independencia de la captación neta de Cl^-.

II. Inhibición selectiva de los flujos iónicos netos.

Los experimentos que a continuación resumiremos, se efectuaron sólo sobre *C. caudiverbera* pre-adaptada en agua destilada y sumergidas en soluciones de NaCl.

Inspirados en el trabajo de BLAUSTEIN y GOLDMAN (1966) investigamos el efecto de un anestésico catiónico (procaína) y otro aniónico (pentobarbital) sobre los flujos netos *in vivo* de cloro y de sodio; la adición de dichos anestésicos prácticamente no alteró la concentración de Cl^- y Na^+ del baño externo ya que las sales utilizadas estaban desprovistas de dichos iones. Los resultados se presentan en los Cuadros 12 y 13. La Figura 12 ilustra dos experimentos típicos de inhibición selectiva.

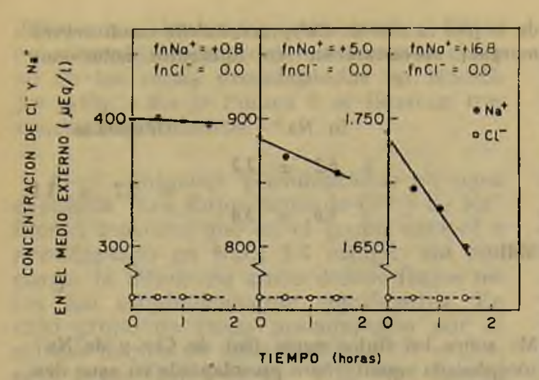


FIG. 10. Captación neta de Na+ a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* pre-adaptada en agua destilada y sumergida sucesivamente en soluciones de Na_2SO_4 de diferente concentración (Rana Nº 39; 146,0 gr). Los flujos netos (fn) están expresados en μEq/hr x 100 gr.

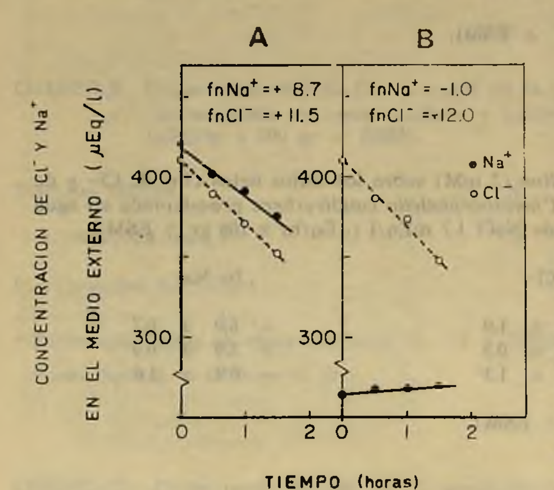


FIG. 11. Captación neta de Cl— a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* pre-adaptada en agua destilada y sumergida sucesivamente en soluciones de NaCl (A) y Cl—colina (B) (Rana Nº 39—B). Los flujos netos (fn) están expresados en μEq/hr x 100 gr.

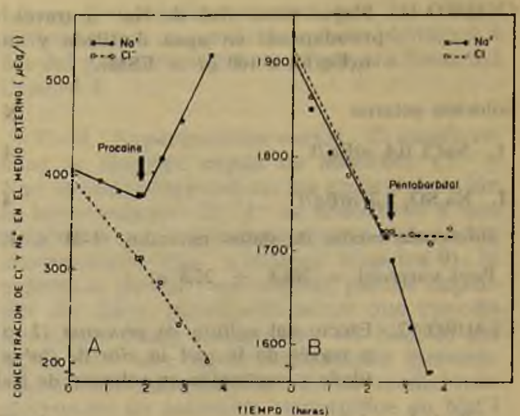


FIG. 12. Efecto de la adición al baño externo de 2 mM de *sulfato de procaína* (A) y de *pentobarbiturato de colina* (B) sobre los flujos netos de Cl— y de Na+ a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera*. Las ranas (Nos. 75 y 101, de 242,0 y 207,0 gr., respectivamente) fueron pre-adaptadas en agua destilada y sumergidas en solución de NaCl.

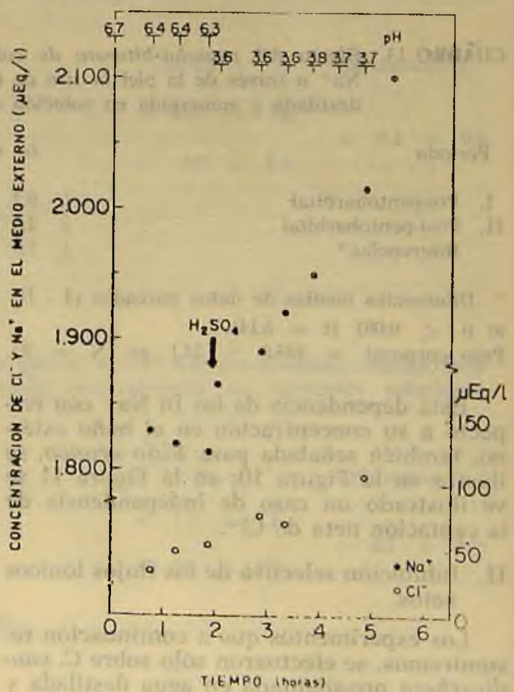


FIG. 13. Efecto de la acidificación del baño externo H_2SO_4 sobre el flujo neto de Na+ a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* pre-adaptada en agua destilada y sumergida en solución de Na_2SO_4 (Rana Nº 243; 155,0 gr).

En ambos casos hubo rapidísima inhibición de uno de los flujos mientras que el otro permaneció prácticamente inalterado. El efecto de los anestésicos duró 3—4 horas.

El sulfato de procaína disminuye notoriamente el pH del baño externo; por ello, investigamos, aunque no de manera sistemática, el efecto del cambio de pH por adición de H_2SO_4 (aproximadamente 0.01 N) en cantidad suficiente para reducirlo a 3.9. Del mismo modo que con procaína, esta modificación produjo una inmediata y prolongada inhibición del flujo neto de Na^+ (Figura 13).

El pentobarbiturato de colina, por su parte, eleva el pH de la solución externa a valores entre 8.2 — 8.9; en este caso, la adición de colina base (hidróxido) en cantidad para provocar aquel cambio de pH no mostró afectar los flujos iónicos netos de la manera en que lo hace el pentobarbiturato.

Capítulo II

LOS IONES INTERCAMBIADOS POR Cl^- Y Na^+

1. Introducción.

Establecido el hecho de que los animales son capaces de captar Cl^- y Na^+ del medio externo, *a*) de manera independiente, y *b*) por intercambio contra iones endógenos, nos preocuparemos en lo que sigue de contestar otra de las preguntas que nos hicimos al comienzo: ¿cuáles son los iones endógenos intercambiados por los externos? Demostraremos que dichos iones internos son HCO_3^- e H^+.

La mayor parte de los experimentos de este Capítulo fueron efectuados sobre *Calyptocephalella caudiverbera*. Más incompleta es la información que poseemos al respecto sobre *Leptodactylus ocellatus* en la que una parte del Na^+ externo se intercambia por NH_4^+ interno.

2. Material y métodos.

Las condiciones en que los animales fueron procesados y muchas de las técnicas analíticas utilizadas son prácticamente iguales a las señaladas en el Capítulo I. En este Capítulo hemos incorporado algunas mediciones adicionales cuyos detalles son los siguientes:

Amonio. Por la técnica de microdifusión modificada (BALINSKY y BALDWIN, 1961) sobre alícuotas del baño externo en el que los animales estaban sumergidos.

Alcidez y alcalinidad totales. Se midieron a la temperatura ambiente, con NaOH (1.9 mEq/l) y HCl (3.5 mEq/l), en un equipo autotitulador Radiometer (TTI), provisto de una bureta automática SBU–1 y un registrador SBR–2 Titrigraph. Se utilizó un equipo con electrodos de vidrio y referencia separados. Los puntos de equivalencias y los pK se determinaron gráficamente.

Valor amortiguador (β). Se determinó por cálculo, de acuerdo a DAVENPORT (1966) y se lo expresó en μEq de ácido (o de base) unidad de pH/hr.

3. Resultados.

I. El catión endógeno.

A. *Amonio.* Los experimentos efectuados en *L. ocellatus* están resumidos en el el Cuadro 14.

CUADRO 14. Flujos netos (fn) de Na^+ y de NH_4^+ a través de la piel *in situ* de *Leptodactylus ocellatus* pre-adaptada en agua potable y sumergida en solución de NaCl (0.5 — 1.3 mEq/l) (μEq/hr x 100 gr ± ESM).

N	Peso corporal (gr)	fn Na^+	fn NH_4^+
9	53.2 ± 4.1	+ 3.7 ± 1.6	— 0.9 ± 0.4

El coeficiente de correlación entre ambos flujos es alto ($r = -0.78$) y estadísticamente significativo ($p < 0.025$; $t = 3.31$) (Figura 14). La correspondiente recta de regresión se expresa por:

$$\text{fn } Na^+ = -3.11 \text{ fn } NH_4^+ + 0.87$$

Se consideró la posibilidad de que el NH_4^+ detectado en el medio externo proviniese de bacterias que habitualmente viven sobre la piel y/o del mucus; para ello se incubaron raspados de la piel de estas ranas. En esas condiciones el NH_4^+ del medio es bajo y permanece prácticamente constante indicando así que el origen del amonio detectado no es espúreo.

En el caso de *C. caudiverbera* no hicimos un estudio exhaustivo y sistemático de la excreción de NH_4^+ por la piel. En este animal nos aseguramos de que sólo el intercambiador catiónico sea el funcional para lo cual los flujos de Na^+ y de NH_4^+ fueron evaluados sumergiendo las ranas (pre-adaptadas en agua destilada) en solución de Na_2SO_4 1.7 mEq/l. Los resultados se resumen en el Cuadro 15.

En estas condiciones, no existe correlación entre la cantidad de Na^+ absorbido y la cantidad de NH_4^+ excretado al medio ($r = -0.66$; $0.4 < p < 0.3$). La Figura 15 ilustra uno de los experimentos resumidos en el Cuadro 15.

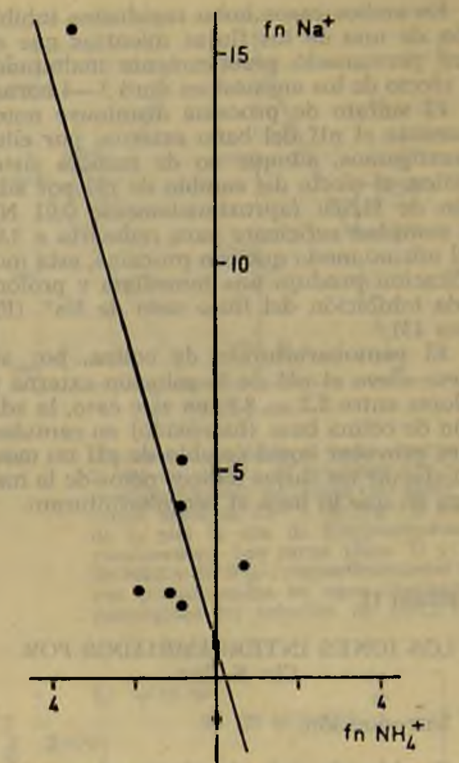


FIG. 14. Correlación entre la captación de Na^+ (fn Na^+) y la excreción de NH^+ (fn NH_4^+) a través de la piel *in situ* de *Leptodactylus ocellatus* (experimentos del Cuadro 14).

CUADRO 15. Flujos netos (fn) de Na^+ y de NH_4 a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* pre-adaptada en agua destilada y sumergida en solución de Na_2SO_4 1.7 1.7 mEq/l (μEq/hr x 100 gr ± ESM).

N	Peso corporal (gr)	fn Na^+	fn NH_4^+
5	245.6 ± 45.1	+ 2.8 ± 2.1	— 0.4 ± 0.3

B. *Hidrógeno*. La medida del H^+ excretado al medio externo se hizo titulando la acidez de alícuotas del medio externo (Na_2SO_4 1.7 mEq/l) en el que estaban sumergidas las ranas (*C. caudiverbera*). El Cuadro 16 resume los resultados de estas mediciones.

En la Figura 16 se ilustra, con un experimento típico, la correspondencia estequiométrica entre el Na^+ captado y el H^+ excretado. La misma correlación se ilustra de manera más elocuente en la Figura 17 donde se ve claramente que la interrupción de la captación de Na^+ va acompañada de una evolución en la excreción de H^+ que es prácticamente su imagen especular.

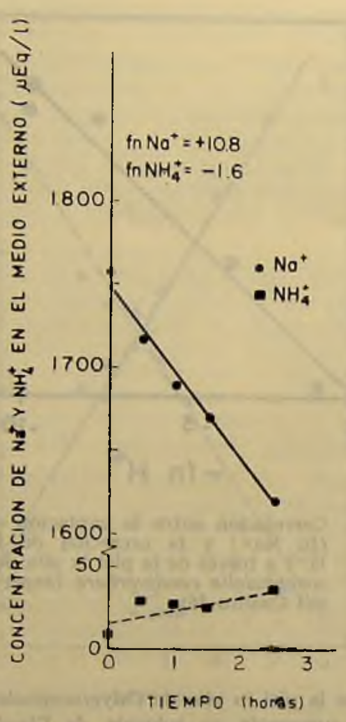


FIG. 15. Captación de Na^+ (fn Na^+) y excreción de NH_4^+ (fn NH_4^+) a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* sumergida en solución de Na_2SO_4 (Rana Nº 72—B; 160,0 gr). Los flujos netos (fn) están expresados en μEq/hr x 100 gr.

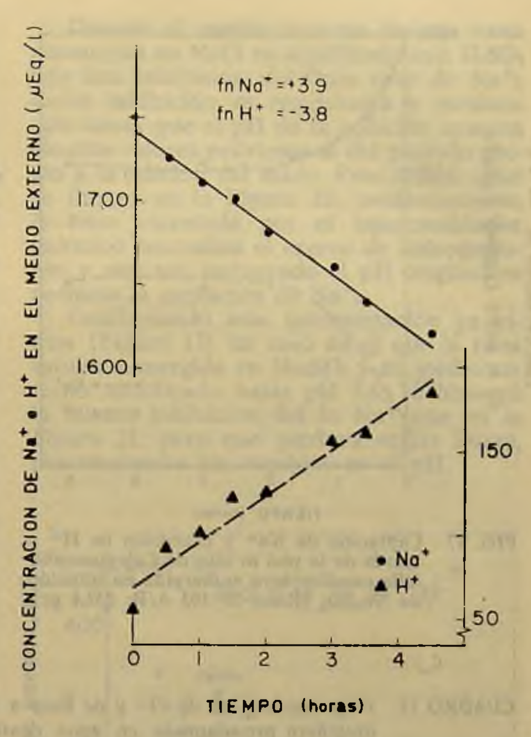


FIG. 16. Captación de Na^+ (fn Na^+) y excreción de H^+ (fn H^+) a través de la piel *in situ* de *Calpytocephalella caudiverbera* sumergida de Na_2SO_4 (Rana Nº 100—B; 224.0 gr). Los flujos netos (fn) están expresados en μEq/hr x 100 gr.

CUADRO 16. Flujos netos (fn) de Na^+ e H^+ a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* pre-adaptada en agua destilada y sumergida en soluciones de Na_2SO_4 1.7 mEq/l (μEq/hr x 100 gr ± ESM).

N	Peso corporal (gr)	fn Na^+	fn H^+
9	235.2 ± 18.3	+ 4.3 ± 1.2	— 4.3 ± 1.2

En la Figura 18 se ilustra la correlación entre los fn Na^+ e H^+; el coeficiente de correlación es alto (r = — 0.99 y estadísticamente significativo ($p < 0.001$; t = 15.58). La recta de regresión se expresa por la fórmula: $fnNa^+ = - 0.93 \cdot fn\ H^+ + 0.44$.

II. El anión endógeno.

Para investigar la naturaleza del anión endógeno, las ranas fueron pre-adaptadas en agua destilada y sus flujos fueron medidos estando sumergidas en soluciones de Cl-colina 0.4 mEq/l. Alícuotas del baño externo fueron igualmente tituladas con NaOH. El Cuadro 17 presenta los resultados de las respectivas mediciones.

En la Figura 19 se ilustra un experimento característico. Puede verse que la absorción de Cl^- es acompañada por la excreción de una Base; la imagen gráfica de la desaparición del Cl^- del baño externo va acompa-

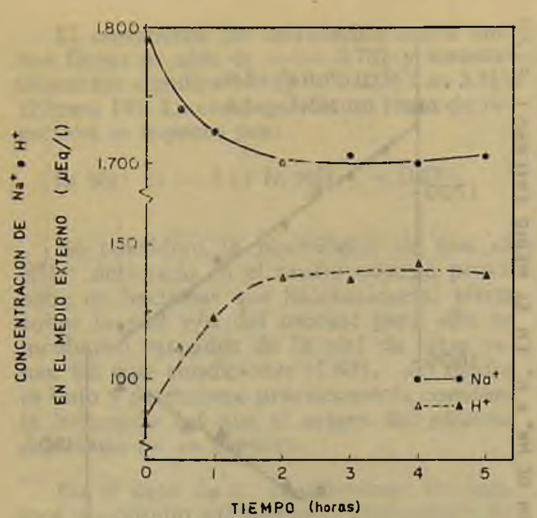


FIG. 17. Captación de Na^{+} y excreción de H^{+} a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* sumergida en solución de Na_2SO_4 (Rana Nº 103 A/B; 233.4 gr).

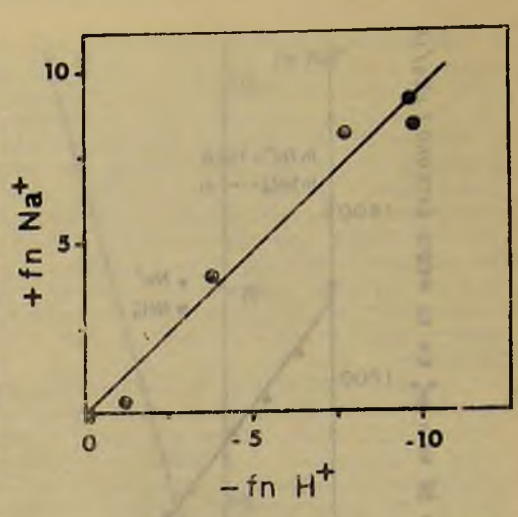


FIG. 18. Correlación entre la captación de Na^{+} (fn Na^{+}) y la excreción de H^{+} (fn H^{+}) a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* (experimentos del Cuadro 16).

CUADRO 17. Flujos netos (fn) de Cl− y de Base a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* pre-adaptada en agua destilada y sumergida en solución de Cl-colina 0.4 mEq/l (μEq/hr x 100 gr ± ESM).

N	Peso corporal (gr)	fn Cl−	fn Base
6	216.9 ± 27.6	+ 8.6 ± 1.8	— 11.8 ± 2.5

ñada simétricamente con la de la aparición de dicha Base.

El coeficiente de correlación (Figura 20) entre ambos flujos netos es alto (r = — 0.96) y estadísticamente significativo ($p < 0.005$; t = 6.78). La recta de regresión se expresa por la fórmula siguiente: fn Cl^{-} = —0.69 . fn B− + 0.40.

El pK de la Base excretada en los experimentos del Cuadro 17 fue 5.91 ± 0.03. Sospechando que la Base en cuestión era HCO_3^{-} preparamos una serie de soluciones artificiales mezclando soluciones de bicarbonato de colina y de Cl–colina en cantidades equivalentes a las que por cálculo se tendrían en las alícuotas de algunos experimentos. El pK de estas soluciones fue 5.90 ± 0.03 (N = 11). Concluimos, pues, que la Base excretada por intercambio con Cl− externo era Bicarbonato.

III. Intercambios iónicos y cambios de pH del medio externo.

Cuando las ranas (*C. caudiverbera*) están sumergidas en NaCl, el pH del medio externo permanece prácticamente inalterado; interpretamos este hecho postulando que los H^{+} secretados por el intercambiador catiónico neutralizan los HCO_3^{-} que el intercambiador aniónico excreta simultáneamente. De allí, el pH del medio externo no resulta ser un indicador apropiado de la secreción de H^{+}.

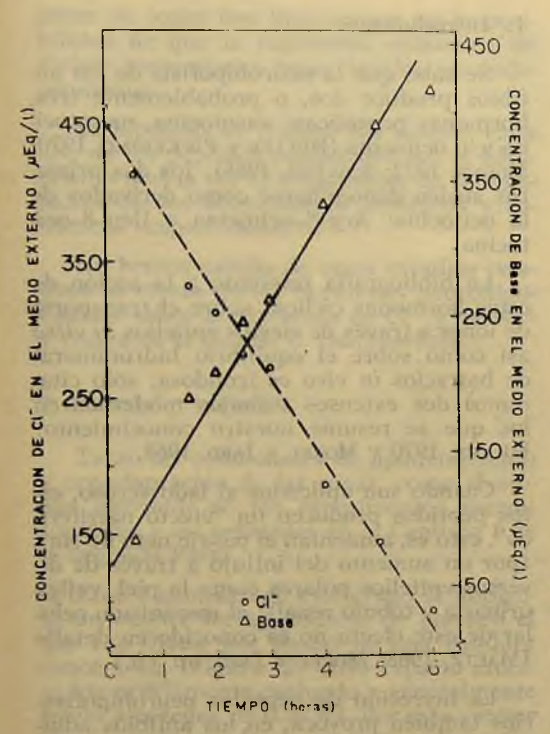


FIG. 19. Captación de Cl— y excreción de Base a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* sumergida en solución de Cl—colina (Rana Nº 98—B; 201.5 gr).

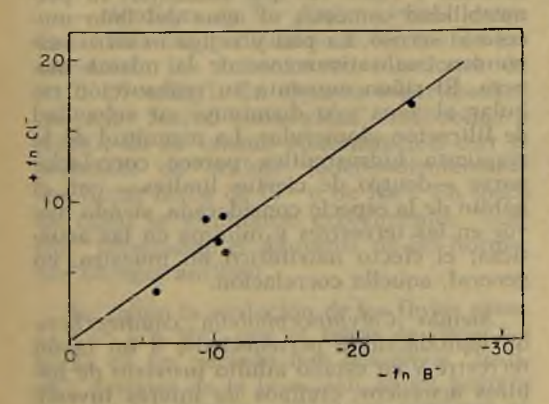


FIG. 20. Correlación entre la captación de Cl— (fn Cl—) y la excreción de Base (fn B—) a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* (experimentos del Cuadro 17).

Cuando el medio externo de una rana sumergida en NaCl es acidificado con H_2SO_4 hay una inhibición del flujo neto de Na^+; dicha inhibición es temporaria y perdura sólo hasta que el pH de la solución externa alcanza valores próximos al del período previo a la adición del ácido. Este último caso se ilustra en la Figura 21; evidentemente, la base excretada por el intercambiador aniónico neutraliza el exceso de hidrogeniones y una vez restaurado el pH original se re-inicia la captación de Na^+.

Confirmando esta interpretación ya vimos (Figura 13) un caso en el que la rana estuvo sumergida en Na_2SO_4 y su medio externo acidificado hasta pH 3.6; se observó la misma inhibición del fn Na^+ que en la Figura 21, pero que perdura varias horas, prácticamente sin cambios en el pH.

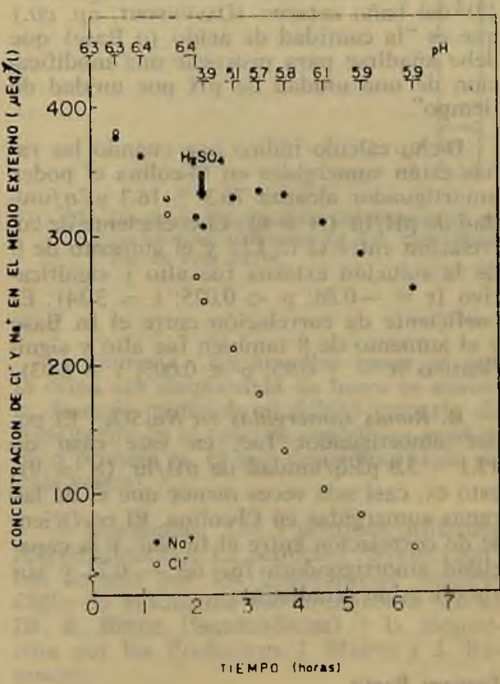


FIG. 21. Efecto transitorio (inhibitorio) de la acidificación del baño externo sobre la captación de Na^+ a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* preadaptada en agua destilada y sumergida en solución de NaCl (Rana Nº 148; 198 gr).

Cuando *C. caudiverbera* estuvo sumergida en Na_2SO_4, hubo una disminución del pH del medio externo de 0.30 ± 0.04 unidades/hr (experimentos del Cuadro 16). Cuando las mismas ranas estuvieron sumergidas en Cl–colina, la modificación del pH del baño externo fue en el sentido de la alcalinización; el pH aumentó 0.15 ± 0.05 unidades/hr (experimentos del Cuadro 17 (medias ± ESM).

IV. Intercambios iónicos y cambios en el poder amortiguador del medio.

A. *Ranas sumergidas en Cl-colina.* Otra evidencia en favor de la conclusión anterior de que la Base endógena excretada por intercambio con Cl^- exógeno es bicarbonato surge del cálculo del "valor amortiguador" (ß) del baño externo (DAVENPORT, *op. cit.*) que es "la cantidad de ácido (o Base) que debe añadirse para provocar una modificación de una unidad de pH por unidad de tiempo".

Dicho cálculo indicó que cuando las ranas están sumergidas en Cl-colina el poder amortiguador alcanza 76.3 ± 16.3 μEq/unidad de pH/hr (N = 6). El coeficiente de correlación entre el fn Cl^- y el aumento de ß de la solución externa fue alto y significativo ($r = -0.86$; $p < 0.025$; $t = 3.34$). El coeficiente de correlación entre el fn Base y el aumento de β también fue alto y significativo ($r = +0.95$; $p < 0.005$; $t = 6.03$).

B. *Ranas sumergidas en Na_2SO_4.* El poder amortiguador fue, en este caso de 13.1 ± 3.8 μEq/unidad de pH/hr (N = 9), esto es, casi seis veces menor que el de las ranas sumergidas en Cl-colina. El coeficiente de correlación entre el fn Na^+ y la capacidad amortiguadora fue de — 0.71 y sin significación estadística.

Tercera Parte

EFECTO DE LAS HORMONAS NEUROHIPOFISIARIAS SOBRE LOS FLUJOS NETOS DE Cl^- Y DE Na^+ A TRAVES DE LA PIEL *IN SITU* Y SOBRE LA DIURESIS DE *CALYPTOCEPHALELLA CAUDIVERBERA*

1. Introducción.

Se sabe que la neurohipófisis de los anfibios produce dos, o probablemente tres, hormonas peptídicas: vasotocina, mesotocina y/u ocitocina (HELLER y PICKERING, 1970; MOENS, 1972; SAWYER, 1968); los dos primeros suelen denominarse como derivados de la ocitocina: Arg–8–ocitocina e Ileu–8–ocitocina.

La bibliografía referente a la acción de estas hormonas cíclicas sobre el transporte de iones a través de ciertos epitelios *in vitro* así como sobre el equilibrio hidromineral de batracios *in vivo* es frondosa; sólo citaremos dos extensos trabajos modernos en los que se resume nuestro conocimiento: FOLLET, 1970 y MOREL y JARD, 1968.

Cuando son aplicados al lado seroso, estos péptidos producen un "efecto natriférico", esto es, aumentan el pasaje neto de Na^+ (por un aumento del influjo a través de diversos epitelios polares como la piel, vejiga urinaria y túbulo renal); el mecanismo celular de este efecto no es conocido en detalle (MAETZ, 1968; MOREL y JARD, *op. cit.*).

La inyección de péptidos neurohipofisarios también provoca, en los anfibios adultos *in vivo* un "efecto hidrosmótico"; los batracios ganan peso por retención de agua. Dicho efecto es la resultante de la respuesta combinada de tres efectores: piel, vejiga urinaria y riñón los que aumentan su permeabilidad osmótica al agua del lado mucoso al seroso. La piel y vejiga *in vitro* responden cualitativamente de la misma manera. El riñón aumenta su reabsorción tubular al agua y/o disminuye su velocidad de filtración glomerular. La magnitud de la respuesta hidrosmótica parece correlacionarse —dentro de ciertos límites— con el hábito de la especie considerada, siendo mayor en las terrestres y mínima en las acuáticas; el efecto natriférico no muestra, en general, aquella correlación.

Siendo *Calyptocephalella caudiverbera* un leptodactílido perteneciente a un taxón terrestre y en estado adulto provisto de hábitos acuáticos, creímos de interés investigar el efecto de la ocitocina, vasotocina y mesotocina sobre sus mecanismos de captación de Cl^- y de Na^+ a través de su piel *in situ*. La demostración de la existencia de dos mecanismos independientes de trans-

porte de iones nos hizo pensar en la posibilidad de que la regulación endocrina de dichos mecanismos fuese igualmente independiente.

La hipótesis de trabajo fue simple: cada uno de los péptidos producidos por el hipotálamo podría ser el responsable de la regulación de los intercambios aniónicos y catiónicos respectivamente.

No hemos sabido de otros estudios relativos al efecto de las hormonas neurohipofisarias sobre la captación de Cl^- y de Na^+ a través de la piel de *C. caudiverbera*.

2. Material y métodos.

Tanto las condiciones de mantenimiento y pre-adaptación de las ranas, como el *modus operandi* de los experimentos fueron similares a las señaladas en el Capítulo I de la Segunda Parte.

En los animales de este grupo se implantó un catéter intraperitoneal de plástico el que fue fijado por medio de una ligadura concéntrica (Figura 22) cuyo espacio muerto fue previamente evaluado y generalmente osciló alrededor de 0.10 ml. Por este catéter se administraron las hormonas, a distancia, sin perturbar a las ranas y con la certeza de que las dosis necesarias eran íntegramente suministradas.

— *Medidas de los flujos iónicos netos.* Casi todas las mediciones se efectuaron sumergiendo los animales en soluciones de NaCl 1.7 mEq/l. En algunos experimentos, las ranas fueron sumergidas en Cl-colina o Na_2SO_4 de la misma concentración con el propósito de evaluar independientemente sus flujos netos de Cl^- o de Na^+. En todos los casos se efectuaron experimentos "control" inyectando el diluyente de las hormonas (Ringer anfibio).

Se siguió la evolución de los flujos netos de Cl^- y/o Na^+ por el lapso de unas 2–3 horas en un período que llamamos "testigo"; después de la inyección de las hormonas (o del Ringer-anfibio) se continuó el control de los flujos de ambos iones en el baño externo por otras 2-3 horas (período "hormona"). Así, los animales fueron controles de sí mismos.

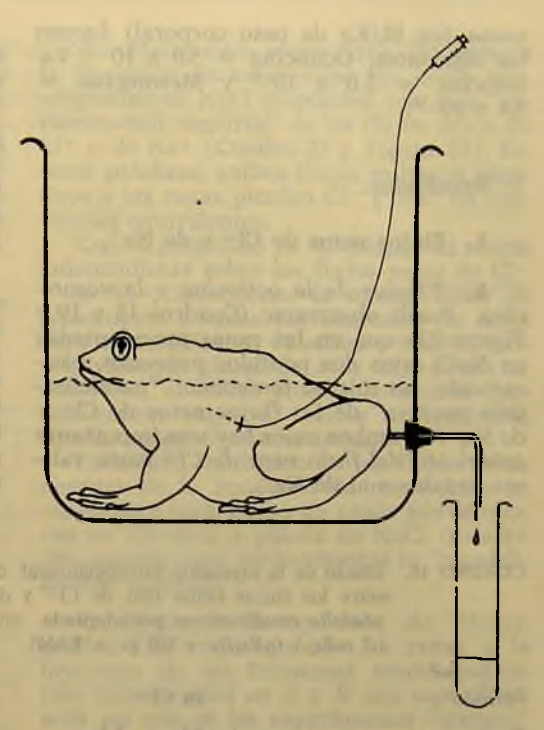


FIG. 22. Diagrama esquemático del dispositivo experimental utilizado en los experimentos de esta Parte.

— *Diuresis.* En aquellos casos en que la orina era desprovista de heces se evaluó la diuresis midiendo el débito urinario directamente en el tubo de centrífuga graduado o probeta en el que desembocaba la cánula vesical.

— *Hormonas.* Los 3 péptidos utilizados fueron sintéticos. La ocitocina "Syntocinon" fue donada por los Laboratorios Sandoz-Chile; la vasotocina fue obsequiada por el Dr. B. BERDE (Sandoz-Suiza) y la mesotocina por los Profesores J. MAETZ y J. RUDINGER.

Las soluciones originales fueron diluídas en Ringer-anfibio y el volumen inyectado en cada caso osciló entre 0.1 y 0.2 ml/100 gr de peso corporal; en los experimentos "control" se inyectó ese mismo volumen de Ringer-anfibio. Las dosis administradas de hor-

mona (en M/Kg de peso corporal) fueron las siguientes: Ocitocina = 5.0×10^{-7}; Vasotocina = 3.0×10^{-8} y Mesotocina = 3.4×10^{-11}.

3. Resultados.

I. Flujos netos de Cl^- y de Na^+.

A. *Efectos de la ocitocina y la vasotocina.* Puede observarse (Cuadros 18 y 19 y Figura 23) que en las ranas pre-adaptadas en NaCl estos dos péptidos provocan, básicamente, un mismo fenómeno: "paralelización positiva" de los flujos netos de Cl^- y de Na^+; en ambos casos hay una importante *inhibición del flujo neto de* Cl^- hasta valores próximos al de Na^+.

En otro grupo de experimentos estudiamos el efecto de la administración de ocitocina y vasotocina a ranas pre-adaptadas en Cl-colina y Na_2SO_4. En el primer caso se observó (Cuadros 20 y 21) igual paralelización; sin embargo, en estas ranas dicho efecto se logró por una importante *inhibición del fn* Na^+ que se reduce hasta valores próximos a los de Cl^-.

En el segundo caso (ranas pre-adaptadas en Na_2SO_4) se notó (Cuadro 22) después de la inyección de ocitocina una notoria *aceleración del flujo neto de* Na^+ mientras que el de Cl^- permanece prácticamente inalterado; la tendencia a la paralelización es evidente toda vez que la diferencia entre los flujos de Cl^- y de Na^+ se reduce en el período hormona, a la mitad.

CUADRO 18. Efecto de la inyección intraperitoneal de *ocitocina* (5.0×10^{-7} M/Kg de peso corporal) sobre los flujos netos (fn) de Cl^- y de Na^+ a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* pre-adaptada en NaCl 3.4 mEq/l y sumergida en solución de NaCl 1.7 mEq/l (µEq/hr x 100 gr ± ESM).

Período	fn Cl^-	fn Na^+	Diferencias *
Testigo	+ 9.8 ± 1.8	+ 7.5 ± 1.3	+ 2.3 ± 0.7[a]
Ocitocina	+ 7.5 ± 1.3	+ 7.3 ± 1.4	+ 0.2 ± 0.4
Diferencias *	+ 2.3 ± 1.0[b]	+ 0.2 ± 0.5	

* Diferencias medias de datos pareados ± ESM.
a: $p < 0.02$ ($t = 3.14$). b: $0.1 < p < 0.05$ ($t = 2.30$).
Peso corporal = 305.8 ± 54.1 gr. (N = 7).

CUADRO 19. Efecto de la inyección intraperitoneal de *vasotocina* (3.0×10^{-8} M/Kg de peso corporal) sobre los flujos netos (fn) de Cl^- y de Na^+ a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* pre-adaptada en NaCl 3.4 mEq/l y sumergida en solución de Na Cl 1.7 mEq/l (µEq/hr x 100 gr ± ESM).

Período	fn Cl^-	fn Na^+	Diferencias *
Testigo	+ 9.1 ± 2.3	+ 5.3 ± 1.6	+ 3.8 ± 1.8[a]
Vasotocina	+ 6.6 ± 2.3	+ 5.6 ± 1.7	+ 1.0 ± 0.6
Diferencias *	+ 2.5 ± 0.7[b]	— 0.3 ± 0.6	

* Diferencias medias de datos pareados ± ESM.
a: $p < 0.05$ ($t = 2.22$).
b: $p < 0.01$ ($t = 3.56$).
Peso corporal = 192.5 ± 24.6 gr. (N = 6).

Queda claro entonces que lo general en el efecto de la ocitocina y de la vasotocina parece ser el fenómeno de la "paralelización" de los flujos netos. Dicha paralelización se logra por inhibición o aceleración de uno de los flujos dependiendo de la historia previa del animal. El efecto (inhibición o aceleración) se ejerce siempre sobre *uno* de los dos flujos.

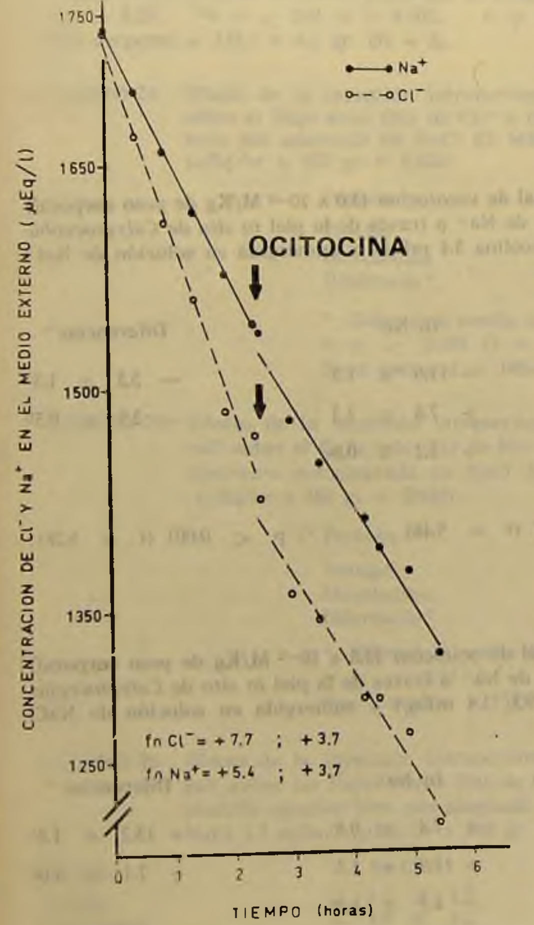


FIG. 23. Efecto de la inyección intraperitoneal de *ocitocina* sobre los flujos netos de Cl— y de Na+ a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* pre-adaptada en NaCl 3.4 mEq/l (Rana N° 212; 533,0 gr). Los flujos netos están expresados en µEq/hr x 100 gr.

B. *Efecto de la mesotocina.* Después de la inyección de mesotocina las ranas pre-adaptadas en NaCl responden con una "paralelización negativa" de los flujos netos de Cl^- y de Na^+ (Cuadro 23 y Figura 24). En otras palabras, ambos flujos se hacen negativos y las ranas pierden Cl^- y Na^+ en cantidades equivalentes.

Con el propósito de investigar su efecto independiente sobre los flujos netos de Cl^- y de Na^+, inyectamos la misma dosis de mesotocina a ranas pre-adaptadas en NaCl pero sumergidas en Cl-colina y Na_2SO_4, respectivamente (Cuadros 24 y 25). Como se observará, el efecto antes mencionado (paralelización negativa) vuelve a registrarse con las mismas características.

La misma inhibición de los flujos netos después de la inyección de mesotocina se observó en otro grupo de ranas pre-adaptadas en Cl-colina y puesta en NaCl (Cuadro 26); en este caso no se observó la "paralelización" anterior.

C. *Efecto de la inyección de Ringer-anfibio.* Las respuestas de las ranas a la inyección de las hormonas neurohipofisarias mencionadas en A y B son específicas toda vez que en los experimentos "control" la sola administración de Ringer-anfibio no reprodujo ninguno de los efectos de dichas hormonas (Cuadro 27). Además, debe decirse que las hormonas provocaron su efecto de manera inmediata (15-30 minutos) el que perduró varias horas.

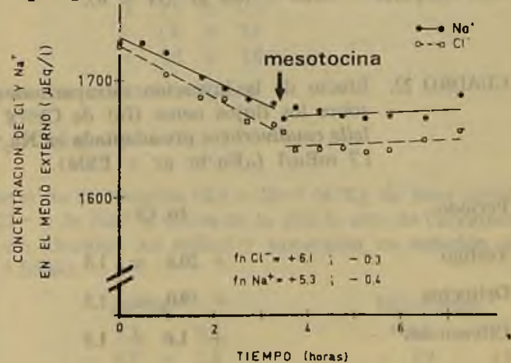


FIG. 24. Efecto de la inyección intraperitoneal de *mesotocina* sobre los flujos de Cl— y de Na+ a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* pre-adaptada en NaCl 3.4 mEq/l (Rana N° 271; 105,8 gr.). Los flujos netos (fn) están expresados en µEq/hr x 100 gr.

CUADRO 20. Efecto de la inyección intraperitoneal de *ocitocina* (5.0 x 10^{-7} M/Kg de peso corporal) sobre los flujos netos (fn) de Cl^- y de Na^+ a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* pre-adaptada en Cl-colina 3.4 mEq/l y sumergida en solución de NaCl 1.7 mEq/l (μEq/hr x 100 gr ± ESM).

Período	fn Cl^-	fn Na^+	Diferencias *
Testigo	+ 3.4 ± 1.0	+ 7.8 ± 1.2	— 4.4 ± 1.1[a]
Ocitocina	+ 4.9 ± 1.2	+ 4.2 ± 0.6	+ 0.7 ± 0.8
Diferencias *	— 1.5 ± 0.9	+ 3.6 ± 0.8[b]	

* Diferencias medias de datos pareados ± ESM.

[a]: $p < 0.01$ ($t = 3.95$); [b]: $p = 0.001$ ($t = 4.63$).

Peso corporal = 231.2 ± 53.1 gr. (N = 6).

CUADRO 21. Efecto de la inyección intraperitoneal de *vasotocina* (3.0 x 10^{-8} M/Kg de peso corporal) sobre los flujos netos (fn) de Cl^- y de Na^+ a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* pre-adaptada en Cl-colina 3.4 mEq/l y sumergida en solución de NaCl 1.7 mEq/l (μEq/hr x 100 gr ± ESM).

Período	fn Cl^-	fn Na^+	Diferencias *
Testigo	+ 5.7 ± 2.1	+ 11.0 ± 1.3	— 5.3 ± 1.3[a]
Vasotocina	+ 4.9 ± 1.5	+ 7.8 ± 1.3	— 2.9 ± 0.5[b]
Diferencias *	+ 0.8 ± 1.2	+ 3.2 ± 0.6[c]	

* Diferencias medias de datos pareados ± ESM.

[a]: $p < 0.01$ ($t = 4.21$). [b]: $p < 0.001$ ($t = 5.48$). [c]: $p < 0.001$ ($t = 5.28$).

Peso corporal = 144.5 ± 16.2 gr. (N = 6).

CUADRO 22. Efecto de la inyección intraperitoneal de *ocitocina* (5.0 x 10^{-7} M/Kg de peso corporal) sobre los flujos netos (fn) de Cl^- y de Na^+ a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* pre-adaptada en Na_2SO_4 3.4 mEq/l y sumergida en solución de NaCl 1.7 mEq/l (μEq/hr gr ± ESM).

Período	fn Cl^-	fn Na^+	Diferencias *
Testigo	+ 20.6 ± 1.5	+ 7.4 ± 0.8	+ 13.2 ± 1.5[a]
Ocitocina	+ 19.0 ± 1.5	+ 11.9 ± 1.3	+ 7.1 ± 1.0[b]
Diferencias *	+ 1.6 ± 1.1	— 4.5 ± 1.2[c]	

* Diferencias medias de datos pareados ± ESM.

[a]: $p < 0.001$ ($t = 8.60$). [b]: $p < 0.001$ ($t = 6.87$). [c]: $p < 0.01$ ($t = 3.62$).

Peso corporal = 243.3 ± 22.5 gr. (N = 6).

CUADRO 23. Efecto de la inyección intraperitoneal de *mesotocina* (3.4 x 10^{-11} M/Kg de peso corporal) sobre los flujos netos (fn) de Cl^- y de Na^+ a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* pre-adaptada en NaCl 3.4 mEq/l y sumergida en solución de NaCl 1.7 mEq/l (μEq/hr x 100 gr ± EEM).

Período	fn Cl^-	fn Na^+	Diferencias *
Testigo	+ 7.8 ± 1.4	+ 5.5 ± 0.8	+ 2.3 ± 1.6[a]
Mesotocina	— 4.3 ± 2.4	— 3.8 ± 2.6	— 0.5 ± 0.9
Diferencias *	+ 12.1 ± 2.7[b]	+ 9.3 ± 1.9[c]	

* Diferencias medias de datos pareados ± ESM.
a: $p = 0.20$; b: $p < 0.01$ ($t = 4.50$); c: $p = 0.001$ ($t = 4.85$).
Peso corporal = 125.7 ± 6.6 gr. (N = 6).

CUADRO 24. Efecto de la inyección intraperitoneal de *mesotocina* (3.4x10^{-11} M/Kg de peso corporal) sobre el flujo neto (fn) de Cl^- a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* pre adaptada en NaCl 3.4 MEq/l y sumergida en solución de Cl-colina 1.7 mEq/l (μEq/hr x 100 gr ± ESM).

Período	fn Cl^-
Testigo	+ 6.8 ± 1.8
Mesotocina	— 1.4 ± 2.2
Diferencia *	+ 8.2 ± 1.0[a]

* Diferencia media de datos pareados ± ESM.
a: $p < 0.001$ ($t = 8.37$).
Peso corporal = 146.0 ± 30.9 gr. (N = 5).

CUADRO 25. Efecto de la inyección intraperitoneal de *mesotocina* (3.4 x 10^{-11}, M/Kg de peso corporal) sobre el flujo neto (fn) de Na^+ a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* pre-adaptada en NaCl 3.4 mEq/l y sumergida en solución de Na_2SO_4 1.7 mEq/l (μEq/hr x 100 gr ± ESM).

Período	fn Na^+
Testigo	+ 2.4 ± 0.5
Mesotocina	— 1.6 ± 0.6
Diferencia *	+ 4.0 ± 1.0[a]

* Diferencia media de datos pareados ± ESM.
a: $p < 0.01$ ($t = 3.97$).
Peso corporal = 159.9 ± 21.3 gr. (N = 7).

CUADRO 26. Efecto de la inyección intraperitoneal de *mesotocina* (3.4 x 10^{-11} M/Kg de peso corporal) sobre los flujos netos (fn) de Cl^- y de Na^+ a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* pre-adaptada en Cl-colina 3.4 mEq/l y sumergida en solución de NaCl 1.7 mEq/l (μEq/hr x 100 gr ±ESM).

Período	fn Cl^-	fn Na^+	Diferencias *
Testigo	+ 1.8 ± 1.6	+ 5.7 ± 0.8	— 3.9 ± 1.1[a]
Mesotocina	— 4.6 ± 2.6	— 0.7 ± 1.5	— 3.9 ± 1.8[b]
Diferencias *	+ 6.4 ± 2.6[c]	+ 6.4 ± 1.7[d]	

* Diferencias medias de datos pareados ± ESM.

a: $p < 0.005$ ($t = 3.65$). b: $0.05 < p < 0.10$ ($t = 2.14$). c: $p = 0.025$ ($t = 2.60$).
d: $p < 0.005$ ($t = 3.83$).
Peso corporal = 222.5 ± 17.9 gr (N = 6).

CUADRO 27. Efecto de la inyección intraperitoneal de *Ringer-anfibio* (1.0 ml/Kg de peso corporal) sobre los flujos netos (fn) de Cl— y de Na^+ a través de la piel *in situ* de *Calyptocephalella caudiverbera* pre-adaptada en diferentes soluciones de 3.4 mEq/l y puesta en solución de NaCl 1.7 mEq/l (promedios en μEq/hr x 100 gr).

Pre-adaptación	N	Peso corporal (gr)	fn Cl— pre	fn Cl— post	fn Na^+ pre	fn Na^+ post
NaCl	3	158.3	+ 7.2	+ 6.5	+ 1.4	+ 1.7
Cl-colina	4	141.3	+ 6.9	+ 6.8	+ 7.4	+ 8.0
Na_2SO_4	4	159.0	+ 16.7	+ 14.7	+ 5.9	+ 5.4

CUADRO 28. Efecto de la inyección intraperitoneal de *ocitocina, vasotocina* y *mesotocina* sobre la diuresis de *Calyptocephalella caudiverbera* pre-adaptada en NaCl 3.4 mEq/l y sumergida en solución de NaCl 1.7 mEq/l (ml/hr x 100 gr ± ESM).

Datos del Cuadro Nº, Hormona inyectada	N	Período Testigo	Período Hormona	Diferencia	Cambio %
18 — Ocitocina	6	1.3 ± 0.4	0.4 ± 0.1	— 0.9 ± 0.4	— 69.2
19 — Vasotocina	5	0.7 ± 0.1	0.3 ± 0.1	— 0.4 ± 0.1	— 57.1
23 — Mesotocina	6	1.4 ± 0.5	1.8 ± 0.6	+ 0.4 ± 0.2	+ 28.6

II. Diuresis.

En los animales pre-adaptados y sumergidos en NaCl la ocitocina y la vasotocina produjeron una inmediata y drástica antidiuresis. La mesotocina, en cambio, está desprovista de aquél efecto; por el contrario, produjo una considerable diuresis (Cuadro 28). Ambos tipos de respuesta fueron visualizados inmediatamente después de la inyección y duraron varias horas.

Cuarta Parte

DISCUSION GENERAL

1. Efecto de las pre-adaptaciones sobre el medio interno.

En el Cuadro 29 se enlistan, comparativamente, las natremias y cloremias de batracios de diverso habitat. Como puede apreciarse, a pesar de su hábito (acuático) dichos valores de *Calyptocephalella caudiverbera* adulta mantenida en agua potable no son diferentes de la de otros anuros. Asimismo, la natremia de *Bufo arunco* es muy próxima a la de otros *Bufo;* tampoco se notan diferencias entre anuros y urodelos. El caso de *Ambystoma mexicanum* muestra que la transición larva (acuática) ⟶ adulto (terrestre) no va acompañada por cambios en las concentraciones séricas de Cl^- y Na^+.

Los resultados del Cuadro 3 indican que los ejemplares de la rana chilena pre-adaptados en diversas soluciones de NaCl pueden considerarse legítimamente como "controles" toda vez que, por lo menos, su natremia y cloremia no son diferentes de la de los animales mantenidos en agua potable.

Antes de ahora (Cuadros 7 y 8) llamamos la atención al hecho de que los flujos iónicos de *B. arunco* y *C. caudiverbera* pre-adaptados en agua destilada resultaban ser muy próximos a los del grupo "control". Si bien este hallazgo merece mayor trabajo experimental, hemos de recordar que CRABBÉ (1963) mostró que la aldosteronemia de *Bufo marinus* mantenido en agua destilada es notoriamente superior a la de los controles. Por otra parte sabemos que *C. caudiverbera* pre-adaptada en agua destilada se deshidrata con respecto a los animales controles (SA-

CUADRO 29. Concentraciones de Cl^- y de Na^+ en el suero de diversos anfibios. Datos en mEq/l.

Especie	Hábito	Cl—	Na^+	Referencias bibliográficas
I. Anuros:				
C. caudiverbera	acuático	69.9	105.6	Este trabajo, Cuadro 3.
R. temporaria	semi-acuático	75.4	103.8	SCHOFFENIELS y TERCAFS, 1965/66.
R. pipiens	semi-acuático	77.0	104.8	HUF, WILLS y ARRIGHI, 1955.
B. marinus	terrestre	100.4	116.2	SHOEMAKER, 1964.
B. arunco	terrestre	——	116.7	PRELLER y GONZÁLEZ, comunicación personal.
II. Urodelos:				
A. mexicanum				
larva	acuático	76.0	107.4	ACEVES, ERLIJ y WHITTEBURY, 1970
adulto	terrestre	81.2	106.1	

LIBIÁN, inédito); las primeras (N = 5) tienen 75.3 ± 0.8% de humedad, mientras que las controles (N = 8) tienen 79.5 ± 1.6% de humedad ($p < 0.005$; $t = 4.40$). Esta deshidratación (4.2%) puede ser estímulo suficiente para aumentar significativamente los niveles circulantes de neuropéptidos (BENTLEY, 1969 b).

Los dos factores antes mencionados (aumento de aldosteronemia y de hormonas neurohipofisarias) pueden ser los responsables de una reabsorción aumentada de Na^+ en la vejiga urinaria y el riñón, de manera que la "normalidad" de los flujos netos de Na^+ no sería más que el reflejo de una natremia "normal" obtenida, indirectamente, gracias a aquellos mecanismos endocrinos que se desencadenarían al pre-adaptar los animales en agua destilada.

BENTLEY (1973) ha mostrado la validez de esta posibilidad en tres anfibios de diverso hábito sumergidos en soluciones diluídas de amilorida; dicho diurético bloquea el influjo de Na^+ de manera que ese tratamiento puede ser equivalente a nuestra pre-adaptación en agua destilada. Después de una inmersión de 15 días la natremia de los batracios en contacto con amilorida no fue diferente a la de los controles mantenidos en agua potable.

La hipótesis que estamos planteando, de ser válida, implica también una inhibición simultánea de la diuresis, una disminución notoria de los iones excretados por el sistema renal y, también, es probable un aumento de la osmolaridad plasmática. En efecto, en algunos experimentos preliminares (SALIBIÁN, PRELLER y ROBRES, inédito) pudimos comprobar que la pre-adaptación de *B. arunco* en agua destilada produce una disminución, aproximada, del 70% de la excreción urinaria de Na^+. Recientemente, A. PRELLER y T. GONZÁLEZ (comunicación personal) confirmaron aquellos resultados previos sobre un número mayor de ejemplares; en el grupo control (N = 25) la concentración de sodio en la orina fue de 4.4 ± 0.4 µEq/l mientras que en el pre-adaptado en agua destilada (N = 15) fue de 1.2 ± 0.2 µEq/l. En otras observaciones, también inéditas hasta ahora, pudimos detectar una disminución del 60% en la diuresis de sapos preadaptados en agua destilada comparados con los controles mantenidos en NaCl.

El reciente hallazgo de ALVARADO (1972), quien mostró que en *Ambystoma tigrinum* deshidratado el Cl^- pasa de los tejidos al plasma, aporta otro elemento más en favor de nuestra postulada "normalidad" de los elementos plasmáticos de animales pre-adaptados en agua destilada.

2. Independencia de los flujos netos de Cl^- y de Na^+.

Los flujos netos de Cl^- y de Na^+ a través de la piel *in situ* son independientes.

Tres son las evidencias experimentales que con diversa fuerza justifican esta conclusión:

a) captación desigual de Cl^- y de Na^+ desde soluciones de NaCl.

b) captación de iones a partir de soluciones en las que el co-ión es impermeante, y

c) inhibición selectiva e inmediata de uno de los flujos mientras el otro permanece inalterado.

En el caso de *Leptodactylus ocellatus* la coincidencia de las medidas de la conductividad del baño externo con las de los flujos netos de Na^+ (pero no con los de Cl^-) (Cuadro 6), sugiere la posibilidad de que en esta especie una parte del Cl^- sea acompañado de Na^+ y que el resto pueda ser intercambiado por algún otro ión endógeno. Posiblemente esta ligazón entre ambos flujos desaparezca cuando aumenten sus concentraciones en el medio externo.

Sin embargo, la disociación de los flujos netos que se observa en las tres especies estudiadas, después de pre-adaptaciones en soluciones de Na_2SO_4, no deja lugar a dudas en cuanto a la posibilidad, por lo menos potencial, de que el Cl^- y el Na^+ puedan ser captados de manera independiente. En el mismo sentido, la captación de Cl^- y de Na^+ desde diferentes soluciones de Cl-colina o de Na_2SO_4 (en el caso de *B. arunco* y *C. caudiverbera*) es una clara y adicional indicación de la independencia que nos ocupa.

Por último, la inhibición instantánea de sólo uno de los flujos (en *C. caudiverbera*) es otra prueba en favor de la independencia de los mecanismos de captación de Cl^- y de Na^+.

A pesar de que las evidencias mencionadas pueden parecer conclusivas por sí mismas, debemos señalar que nuestros resultados en *B. arunco* y en *C. caudiverbera* parecen indicar que por debajo de ciertas concentraciones de NaCl, la presencia de Cl^- condiciona, de una manera difícil de interpretar por ahora, la permeabilidad de la piel *in situ* al Na^+. Cuando los flujos de Na^+ se miden en animales sumergidos en Na_2SO_4 es necesario aumentar varias veces la concentración del medio externo hasta lograr flujos netos que sean comparables con los obtenidos cuando están en soluciones de NaCl. De todas maneras, es evidente que por encima de ciertas concentraciones la independencia es real y los animales son capaces de captar Na^+ desde soluciones de sulfato de sodio.

Aquella interdependencia de los flujos de Cl^- y de Na^+ *in vivo* por debajo de cierta concentración externa parece ser una característica común a diversos epitelios; también ocurre, por ejemplo, en *Astacus* (SHAW, 1959, 1960 a), en larvas de *Aedes aegypti* (STOBBART, 1965, 1967), en la piel *in vitro* de *Rana ridibunda* (FERREIRA, 1968, 1973) y de *Ambystoma mexicanus* (ACEVES, ERLIJ y EDWARDS, 1968) y en la de *A. gracile, in vivo* (ALVARADO y STIFFLER, 1970).

Tanto en *B. arunco* como en *C. caudiverbera* hay una relación entre la concentración de Na^+ en el baño externo y su flujo neto *in vivo* (Figuras 8 y 10). CARLISKY, CEREIJIDO, BARRIO y MIGLIORA (1970) mostraron que la piel aislada de la rana chilena es también capaz de transportar Na^+ activamente desde soluciones muy diluídas de Na_2SO_4 y que cuando la concentración externa llega a los 115. mM el sistema se satura (0.29 ± 0.02 $\mu Eq/hr \times cm^2$). Esta misma dependencia concentración/flujo neto fue señalado para el caso del transporte de Cl^- y de Na^+ a través de la piel aislada de *Leptodactylus ocellatus* (FISCHBARG, ZADUNAISKY y DE FISCH, 1967; ROTUNNO y CEREIJIDO, 1966). Sin embargo, nosotros no hemos podido detectar una dependencia similar en los flujos netos de Cl^- *in vivo* de *C. caudiverbera* preadaptada en agua destilada y sumergida en soluciones diluídas de NaCl. Posiblemente, las concentraciones de NaCl en que las ranas fueron sumergidas para las medidas de los flujos netos hayan sido muy bajas. La velocidad de penetración de Cl^- es, en nuestros casos, independiente del catión acompañante; esta es una de las diferencias cruciales con la mayor parte de los datos de flujos netos de Cl^- *in vitro* los que se describen acoplados al Na^+. Nos llama la atención que cuando se miden simultáneamente, los flujos netos de Cl^- son siempre mayores que los de Na^+; se trata de una característica que resultó ser común a las tres especies estudiadas.

La captación independiente de iones se sabe que ocurre *in vivo* a través de las branquias de crustáceos (SHAW, *op. cit.*) y de peces eurihalinos o de agua de mar (MAETZ, 1968; MOTAIS, 1967; MOTAIS y GARCÍA ROMEU, 1972), en larvas de artrópodos (STOBBART, 1965, 1967, 1971), salamandras (DIETZ, KIRSCHNER y PORTER, 1967) y anuros (ALVARADO y MOODY, 1970), cutícula de anélidos (DIETZ y ALVARADO, 1970), plantas (MAC ROBBIE, 1970) y microorganismos (SLAYMAN y SLAYMAN, 1968). La información que poseemos referente a especies de anuros adultos confirma la independencia *in vivo* de los flujos netos de Cl^- y de Na^+ (Cuadro 30).

CUADRO 30. Flujos netos (fn) de Cl— y de Na+ a través de la piel *in situ* de diversos anfibios pre-adaptados en diferentes soluciones y sumergidos en soluciones de NaCl (0.9 — 3.0 mM). Medias en μEq/hr x 100 gr.

Especie	Solución de pre-adaptación	fn Cl−	fn Na+	Diferencias **
R. temporaria (4) — a	$NaHCO_3$ — 120*	+ 20.3	— 7.2	+ 27.5
R. temporaria (4) — a	agua destilada	+ 15.8	+ 17.5	— 1.7
R. esculenta (6) — a	$NaHCO_3$ — 10	+ 50.7	+ 25.4	+ 25.3
R. esculenta (6) — a	$CaCl_2$ — 2	— 7.7	+ 25.4	— 33.1
L. ocellatus (6) — b	Na_2SO_4 — 0.4	+ 9.5	+ 1.9	+ 7.6
B. arunco (5) — c	Cl—colina — 1.7	+ 8.4	+ 26.6	— 18.2
C. caudiverbera (40) — d	NaCl — 3.4	+ 7.8	+ 5.5	+ 2.3

Entre paréntesis, número de mediciones.

*) Concentración de las soluciones, en mM

**) Diferencia algebraica (fn Cl— — fn Na+)

Referencias bibliográficas:
a: JORGENSEN, LEVI y ZERAHN, 1954.
b: Este trabajo, Cuadro 5.
c: Este trabajo, Cuadro 7.
d: Este trabajo, Cuadro 8.

Habiendo quedado demostrado que la piel *in situ* es capaz de captar un anión o un catión de manera independiente, debemos concluir que el mecanismo más probable que estaría involucrado en dichos procesos es el de intercambio estequiométrico de aquellos iones externos (Cl^- y Na^+) por otros de origen endógeno. En otras palabras, debemos postular la existencia, por lo menos, de dos intercambiadores iónicos, uno aniónico y el otro catiónico. Es evidente que esta posibilidad es la única que permite mantener la electroneutralidad de las soluciones en las que los animales están sumergidos.

MOTAIS y GARCÍA ROMEU (1972) avanzaron una interpretación general y simple de estos mecanismos de captación independiente de Cl^- y de Na^+ por la piel *in vivo* de los batracios la que consideramos pertinente y de la que nos permitimos adoptar algunas de sus consideraciones. Dicha interpretación postula, básicamente, la presencia de cargas fijas en la membrana lo que daría cuenta de: *a*) la independencia, concibiendo la existencia de poros provistos de cargas (positivas o negativas); los co- iones impermeantes no penetrarían por impedimentos estéricos más que por efecto de carga, y *b*) del efecto del pH: los cambios de pH provocarían modificaciones en la ionización de los poros, lo que a su vez sería responsable del comportamiento de la piel, por ejemplo, al ser acidificada. Los resultados de los experimentos de inhibición con anestésicos locales también sugieren la validez de la mediación de las cargas fijas de los fosfolípidos de las membranas (BLAUSTEIN y GOLDMAN, 1966).

Aunque por ahora sin bases experimentales sólidas, proponemos un mecanismo final compuesto por los intercambiadores aquí estudiados, que regulen de alguna manera la calidad y cantidad de los iones que entran, acoplado a una bomba iónica capaz de realizar el trabajo necesario para el transporte de los iones en contra de su gradiente electroquímico (véase KIRSCHNER, 1970).

La ubicación precisa de los intercambiadores así como su exacta naturaleza escapan a nuestro conocimiento actual.

3. Naturaleza de los iones endógenos intercambiados por Cl^- y Na^+ externos.

— *Amonio.* Los datos cuantitativos referentes a la excreción de NH_4 por la piel de anfibios son escasos. En el Cuadro 31 se comparan las mediciones efectuadas sobre *Leptodactylus ocellatus* y *Calyptocephalella caudiverbera* con algunos datos correspondientes a otras especies.

CUADRO 31. Excreción de NH_4^+ (fn NH_4^+) a través de la piel *in situ* de diferentes anfibios (medias, en μEq/hr x 100 gr).

Especie	Hábito	fn NH_4^+	Referencias bibliográficas
I. Anuros			
L. ocellatus	semi-acuático	— 0.9	Este trabajo, Cuadro 14.
C. caudiverbera	acuático	— 0.4	Este trabajo, Cuadro 15.
X. laevis	acuático	— 4.0	BALINSKY y BALDWIN, 1961.
II. Urodelos			
A. tigrinum (larvas)	acuático	— 7.1	DIETZ, KIRSCHNER y PORTER, 1967.
N. maculosus	acuático	— 12.3	FANELLI y GOLDSTEIN, 1964.
A. gracile (larvas)	acuático	— 20.0	ALVARADO y STIFFLER, 1970.

Si bien la principal vía de excreción nitrogenada es, en los anfibios adultos, el sistema renal, la piel juega un rol no despreciable; KROGH (1939) fue el primero en sugerir, aunque sin pruebas experimentales, que el intercambio de cationes externos podría efectuarse a través de la piel, por NH_4^+ endógeno.

En algunas especies de batracios, como en *Necturus maculosus* el 90% de la excreción nitrogenada se hace (como NH_4^+) a través de la piel (FANELLI y GOLSTEIN, 1964). Por otra parte, hay casos en los que la piel juega un papel despreciable en la eliminación del NH_4^+; tal es el caso de *Xenopus laevis* que elimina menos del 15% de amonio de la piel (BALINSKY, 1970). Coincidentemente, nuestros resultados en *C. caudiverbera* y en *L. ocellatus* sugieren, sin duda, que la piel de estas especies no es el lugar principal de excreción nitrogenada; la cantidad de NH_4^+ excretada por la piel de la primera corresponde, aproximadamente, al 1% de la eliminada por la orina (ESPINA, ROJAS y SALIBIÁN, en preparación).

Los resultados en *L. ocellatus* (Cuadro 14) sugieren un intercambio parcial de Na^+/NH_4^+. Sin embargo, si dicho intercambio fuese real, la inyección de sales de amonio debería producir un aumento substancial en el flujo neto de Na^+ como ocurre en peces dulceacuícolas y marinos (MAETZ y GARCÍA ROMEU, 1964; PAYAN y MAETZ, 1973). No obstante, en algunos experimentos previos, la inyección intraperitoneal de sulfato de amonio (1 mEq/100 gr de peso corporal) a *L. ocellatus* no produjo, en ningún caso, modificaciones en los flujos de Na^+. Por eso creemos que la correlación observada entre la excreción de amonio y la captación de Na^+ (Figura 14) debe ser fortuita y que su explicación resida simplemente en algún mecanismo de difusión pasiva de NH_3. En este mismo caso de *L. ocellatus* puede ser válida la explicación sugerida por MAETZ (1972, 1973) en el sentido de que el intercambio Na^+/NH_4^+ no sea obligatorio y que dependa, por ejemplo, de la magnitud de los fn Na^+ la que establecería un "umbral" por encima del cual el Na^+ se intercambia por H^+ mientras que por debajo predominaría el proceso Na^+/NH_4^+.

En *C. caudiverbera* (Cuadro 15) no parece existir correlación alguna entre el Na^+ captado y el NH_4^+ eliminado el medio externo.

— *Hidrógeno y bicarbonato.* Se sabe que la piel de los batracios *in vivo* e *in vitro* es capaz de crear a ambos lados de ella un gradiente de H^+; el lado mucoso se acidifica y el seroso (o interno) se alcaliniza (EMI-

LIO, MACHADO y MENANO, 1970; FLEMING, 1957; FRIEDMAN, LAPRADE, AIYAWAR y HUF, 1967; FRIEDMAN, AIYAWAR, HUGHES y HUF, 1967). Nuestros resultados confirman aquélla capacidad y estamos en condiciones de interpretarla como una consecuencia del intercambio Na^+/H^+; USSING (1949) había sugerido previamente esta alternativa.

FLEMING (*op. cit.*) descartó la posibilidad de este mecanismo de intercambio catiónico al no poder detectar cambios en el pH de la solución externa. En efecto, es imposible correlacionar los cambios de pH en el medio externo con los cambios reales en la concentración de H^+ ya que estando ambos intercambiadores funcionando, el medio externo se amortigua; así, los H^+ secretados por el Na^+ externo captado, son atrapados por la solución externa y el pH prácticamente no se modifica; por eso, la forma correcta de evaluar la excreción de hidrogeniones por la piel *in vivo* es titular alícuotas de la solución externa hasta neutralidad teniendo sumergidos los animales en soluciones en las que el anión sea impermeante (por ejemplo, Na_2SO_4).

Los resultados de EMILIO y colaboradores (*op. cit.*) muestran también que en la piel aislada de *Rana rudibunda* no hay relación entre la corriente de corto-circuito y la excreción de H^+; este hallazgo permite concluir que bajo condiciones *in vitro* el intercambio Na^+/H^+ no es funcional y que el transporte de H^+ hacia el lado mucoso no es, como lo señaló GARCÍA ROMEU (1971), condición para que exista transporte neto de Na^+ hacia el lado seroso.

En el caso del intercambiador aniónico no parece haber dificultad en reconocer al bicarbonato como el anión endógeno excretado para compensar el Cl^- absorbido cuando *C. caudiverbera* está sumergido en Cl-colina o en NaCl. Los valores de pK de la Base excretada así como el significativo aumento de la capacidad amortiguadora de la solución externa, indican que el HCO_3^- debe ser ión involucrado en el intercambio; este último argumento excluye la alternativa de que otros aniones, OH^-, por ejemplo, puedan ser los intercambiados a través de la piel.

La inhibición del transporte neto de Na^+ *in vivo* que hemos observado después de acidificar la solución externa es una propiedad también descrita en la piel *in vitro* de diversas especies (FUNDER, USSING y WIETH, 1967; SNELL y MC INTYRE, 1960).

Resultados similares a los nuestros fueron publicados recientemente por KIRSCHNER, GREENWALD y KERSTETTER (1973) en la piel intacta de *Rana pipiens*; GARCÍA ROMEU (comunicación personal) ha extendido estos hallazgos a la piel de *R. esculenta.*

Aparte de los anfibios, la captación de iones por intercambio *in vivo* en epitelios ha sido postulada, como lo hemos señalado anteriormente, en numerosos casos. En las branquias de peces hay evidencias directas e indirectas de que los intercambios que ocurren en ellas son Na^+/NH_4^+, Na^+/H^+ y Cl^-/HCO_3^- (KERSTETTER, KIRSCHNER y RAFUSE, 1970; MAETZ, 1972; MOTAIS y GARCÍA ROMEU, 1972; PAYAN y MAETZ, 1973). STOBBART (1971) demostró que las larvas de *Aedes aegypti* son capaces de intercambiar parcialmente el Cl^- y el Na^+ externos por HCO_3^- e H^+, respectivamente.

4. Origen de los iones endógenos.

En la mayor parte de los anfibios, el CO_2 se excreta principalmente a través de la piel mientras que el O_2 se absorbe mayormente por los pulmones (FOXON, 1964; HUTCHISON, WHITFORD y KOHL, 1968; WHITFORD y HUTCHISON, 1965). Siendo que la piel de los batracios carece de anhidrasa carbónica (MAREN, 1967), cabe preguntarse por el origen del bicarbonato intercambiado por cloro cuando los animales están sumergidos en diversas soluciones; en este contexto, también es lícito pensar en la posible relación entre el CO_2 respiratorio y el HCO_3^- eliminado al medio (ROBIN, BROMBERG y CROSS, 1969).

A la luz de los datos de FRIEDMAN, LAPRADE, AIYAWAR y HUF (*op. cit.*) que muestran que la concentración de HCO_3^- de la piel de *Rana pipiens* es prácticamente igual a la de su plasma, es razonable postular que la sangre es el lugar de origen del bicarbonato detectado en las soluciones externas.

Las curvas de disociación del CO_2 en el plasma de anfibios muestran que la sangre de este grupo lo retiene mucho más que la de otros vertebrados (FOXON, *op. cit.;* PROSSER y BROWN, 1965; REDFIELD, 1933) especialmente, bajo forma de HCO_3^- efectivamente, la concentración de HCO_3^- del plasma de los batracios es superior a la de otros vertebrados acuáticos (RAHN, 1966 b).

El papel respiratorio de la piel de los anfibios ha de ser diferente según si el animal está dentro o fuera del agua. La captación de O_2 por la piel será mucho menor en agua debido a la escasa solubilidad de aquel gas en agua; por eso es evidente que en *C. caudiverbera* sumergida en soluciones la efectividad de la piel como órgano respiratorio es muy limitada.

Esta aparente insuficiencia de la piel es compensada en los anfibios adultos por una mayor concentración de hemoglobina (respecto a los peces) que permite un transporte de O_2 aumentado (LENFANT y JOHANSEN, 1972) [7].

Del mismo modo, la afinidad de la Hb por el O_2 decrece gradualmente cuando se compara esa propiedad en vertebrados de hábitos acuáticos con los de hábitos terrestres; en otras palabras, esta disminución de la afinidad de la Hb por O_2 no es más que un aumento de la presión parcial de oxígeno en la sangre y, por consiguiente, su mayor disponibilidad por parte de los tejidos (JOHANSEN y LENFANT, 1972; LENFANT y JOHANSEN, 1967, 1972).

En el aire, en cambio, la mayor captación de O_2 ha de provocar una mayor conversión de la Hb en oxihemoglobina, lo que a su vez disminuye el pH (JUST, GATZ y CRAWFORD, 1973; RAHN, 1966 a) y la acidosis producida provocaría una disociación del HCO_3^- en CO_2 y H_2O en una reacción catalizada por la anhidrasa carbónica de los glóbulos rojos.

Por lo anteriormente expuesto, cuando los animales están en el aire la piel asume un importante rol respiratorio y excreta principalmente CO_2; en cambio al estar los animales sumergidos, aquella disociación no ha de ocurrir o ha de ocurrir en muy baja proporción, con lo que el ión predominante sería de HCO_3^-, el que finalmente será excretado por intercambio con Cl^- externo. La inmersión debe significar un "shift" en la excreción de CO_2 a HCO_3^- debido a la muy diferente disponibilidad de O_2 ambiental.

Con respecto al H^+ intercambiado por Na^+ podemos postular un origen similar. Si el HCO_3^- es eliminado por la piel, el H_2CO_3 debe disociarse como $HCO_3^- + H^+$ para poder mantener el equilibrio HCO_3^-/H_2CO_3.

Así, los mecanismos de captación aquí discutidos están ligados íntimamente a los procesos respiratorios que residen en la piel y al mantenimiento del equilibrio ácido-base.

5. Efecto de las hormonas neurohipofisarias sobre los flujos netos de Cl^- y de Na^+.

La ocitocina y la vasotocina produjeron, en *Calyptocephalella caudiverbera* básicamente el mismo tipo de respuesta que denominamos como "paralelización positiva" de los flujos; dicha paralelización se logra, en ambos casos, por la inhibición del flujo neto de Cl^- mientras que el de Na^+ permanece prácticamente inalterado. El resultado final es que la piel de las ranas controles (o pre-adaptadas en NaCl) pierde su conocida capacidad de discriminar independientemente la captación de iones del medio externo y los incorpora, inmediatamente después de la inyección, juntos, a la misma velocidad. Cuando ambos péptidos son administrados a ranas pre-adaptadas en Cl-colina se logra el mismo efecto final (paralelización) pero por un mecanismo diferente: el fn Na^+ se inhibe mucho más que el de Cl^- (que permanece casi sin modificarse).

Por otra parte nos encontramos con que en los animales Cl-deficientes (mantenidos en Na_2SO_4) e inyectados con ocitocina se ve la misma tendencia a la paralelización pero por un mecanismo diferente, esto es, por aceleración del flujo más lento (fn Na^+). La respuesta no es, en este caso, tan clara como en el caso de las ranas controles y pre-adaptadas en Cl-colina, lo que podría deberse, posiblemente, a que la dosis inyectada fue insuficiente para lograr una paralelización real.

De manera más general diremos que después de la administración de ocitocina y de vasotocina, el flujo neto más alto es el que se inhibe o que la historia iónica previa del animal condiciona la respuesta que es en ambos casos la misma: paralelización positiva de los flujos.

Después de la inyección de mesotocina, en cambio, nos encontramos que tanto las ranas controles como las mantenidas en Cl-colina responden con una "paralelización

[7] El lector podrá encontrar información adicional referente a la hematología de *C. caudiverbera* en el trabajo de GONZÁLEZ, VALLEJOS y DELGADO (1969).

negativa"; en otras palabras, las ranas empiezan a perder, de inmediato, ambos iones a la misma velocidad y su piel también pierde la capacidad de separar ambos flujos como ocurría en el período testigo de los experimentos. Más aún, cuando los flujos son medidos sobre ranas sumergidas en soluciones en las que el co-ión es impermeante, también se observa la misma inhibición.

La respuesta de *C. caudiverbera* a la inyección de ocitocina y vasotocina es cualitativamente semejante y es claro que la segunda fue igualmente activa en dosis 15 veces menores; esto habla en favor de una mayor sensibilidad de sus efectores a ella, confirmando hallazgos de otros autores (BENTLEY, 1969 a; HELLER, 1965; JARD, 1966) quienes interpretan este comportamiento como prueba de que la hormona natural es la Arg--8--ocitocina.

En nuestros experimentos sobre animales controles, la ocitocina y la vasotocina provocaron inhibición del flujo de Na^+ contrariamente a lo que clásicamente se describe como "efecto natriférico" en la piel *in vitro* de batracios (BENTLEY, 1971; MOREL y JARD, 1968; SAWYER, 1968).

Esta es una de las pocas veces en la que se evaluó el efecto de las hormonas posterohipofisarias sobre el transporte *in vivo* de Cl^- y de Na^+ simultáneamente; siendo el animal testigo de sí mismo es posible comparar con precisión los efectos de la inyección sobre cada rana.

La ocitocina y la vasotocina provocaron, además, una severa antidiuresis (Cuadro 28); la mesotocina, por el contrario, produjo un ligero aumento del débito urinario coincidentemente con resultados de JARD (*op. cit.*). Lamentablemente nuestra preparación no permite definir el o los efectores del sistema renal que responden a estos péptidos.

Los efectos hasta aquí comentados *a*) son inmediatos, *b*) perduran varias horas y *c*) son específicos. No obstante, son difíciles de interpretar y si debemos adelantar alguna explicación hemos de reconocer que la información brindada por nuestras experiencias hablan a favor de un sistema de hormonas de efecto antagónico; unas alteran la entrada de iones, mientras que la tercera modifica su salida por la piel. Otro tanto es válido para la diuresis.

El significado fisiológico de las "paralelizaciones" no es claro y la interpretación final y correcta evaluación de los efectos aquí comentados requiere de mayor información sobre el efecto simultáneo de estos péptidos sobre el pasaje de agua por la piel. En algunos experimentos inéditos aún (SALIBIÁN, ESPINA, ROJAS y ZAMORANO, en preparación) medimos el efecto de estos péptidos sobre la captación de agua; encontramos que con dosis iguales a las utilizadas en los experimentos de flujo, la vasotocina y la ocitocina producen un ligero aumento de la captación de agua, mientras que la mesotocina produce un efecto contrario. De ser confirmados estos hallazgos preliminares, nuestra explicación adquiriría otra dimensión pues estaríamos en condiciones de afirmar que unas producen dilución del medio interno, mientras que la Ileu-8-ocitocina lo concentraría. Una interpretación muy próxima a ésta fue sugerida por SAWYER (1972).

Es posible que la regulación endocrina de estos mecanismos de intercambio iónico que nos preocupaba al comienzo, sea mediada por otras hormonas (conocidas o no). Queda claro que el efecto de los péptidos neurohipofisarios sobre la captación de iones no es tan simple como generalmente se acepta; también queda ilustrado, una vez más, que el comportamiento de la piel *in vitro* no es extrapolable a las condiciones *in vivo*. En el mismo sentido, BENTLEY y MAIN (1972) mostraron que la magnitud del efecto natriférico de la vasotocina sobre la piel *in vitro* depende del área de la piel escogida para efectuar las mediciones.

6. Algunas consideraciones finales.

Durante la larga y compleja historia de la colonización de la tierra, la pérdida de las branquias ha debido ser un momento crucial; es allí donde la piel, hasta entonces posiblemente inerte frente a los cambios externos, reemplaza a la branquia y asume muchas de sus funciones. Así puede explicarse que el intercambio del Na^+ externo por NH_4^+ o H^+ sea un mecanismo común a los epitelios de peces y anfibios. La nueva función de la piel, además, llega a ser complementaria del sistema renal y se imbrica en los mecanismos respiratorios creando una nueva alternativa evolutiva. Mucho después, al aparecer los reptiles, es cuando la respiración pulmonar se perfecciona y reem-

plaza definitivamente a la piel tanto en la función de absorber O_2 como en la de eliminar el CO_2; la instauración concomitante del ureotelismo también desplaza a la función de la piel como órgano de excreción de productos nitrogenados.

Sin embargo, la permeabilidad de los epitelios a los gases es indisociable de la permeabilidad del agua y los iones en ella disueltos; es por ello que si bien los anfibios fueron capaces de vivir en tierra firme nunca pudieron desligarse totalmente de su dependencia del agua. Probablemente, dicha dependencia sea, en realidad, sólo una limitación secundaria del desarrollo de su nuevo sistema respiratorio cutáneo.

Evidentemene la respiración aérea tiene la ventaja de un ambiente más rico en oxígeno que el agua; sin embargo, el peligro de la desecación es una desventaja que siempre acompaña a la ventaja anterior. Por eso, siendo que cada ambiente ofrece la paradójica situación de ventaja y desventaja simultáneamente, la evolución de los procesos ha de haber seguido un curso muy especial en el intento de superar las desventajas y de desarrollar otras alternativas que permitan enfrentar las nuevas situaciones.

Esta función homoestática que la piel adquiere, tiene en los anfibios acuáticos como *C. caudiverbera*, una significación diferente ya que permite al animal respirar largos períodos de tiempo bajo el agua. Junto a esta adaptación llama la atención que la frecuencia cardíaca de la rana chilena cuando está sumergida es extremadamente baja (AGUIRRE y colaboradores, 1969) lo que habla en favor de una menor demanda metabólica (lo que había sido demostrado en 1954 por GÜNTHER y MICCO).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo satisfizo parte de los requerimientos establecidos para obtener el título de Doctor en Ciencias con mención en Biología de la Universidad de Chile; fue presentado y defendido en acto público llevado a cabo en la sede de la Facultad de Ciencias el 28 de noviembre de 1973. El autor no ha querido modificar el texto original de su trabajo; por ello la Bibliografía registra las referencias consultadas hasta julio de 1973.

Escribir esta Tesis no fue tarea fácil; requirió sintetizar y concretar muchas ideas manejadas y maduradas por varios años, entre varios colegas; hubo que re-calcular decenas de experimentos, hubo que confeccionar numerosos Cuadros, figuras, etc. Una parte de los resultados ya vieron la luz; el resto se trata de datos inéditos hasta ahora.

Deseo agradecer de manera especial a los que participaron en la elaboración de los innumerables experimentos que a continuación se presentan. La lista sería larga; nombraré de manera destacada, por orden alfabético, a quienes aportaron su inextinguible entusiasmo en esta tarea de empezar a entender algunos aspectos de la fisiología de los anfibios: ALICIA CARRASCO, SONIA ESPINA, ROBERTO MORENO, SILVIA PEZZANI, ANA PRELLER, LUIS ROBRES, MIREYA ROJAS y BERTA ZAMORANO.

Quiero destacar a los Padrinos de esta Tesis, Profesores Doctores JUAN CONCHA, HUMBERTO MATURANA y FERNANDO VARGAS, quienes con su experiencia, amistad y, sobre todo, paciencia, hicieron que este trabajo fuese considerablemente diferente de la primera versión que llegó a sus manos.

Mi gratitud se extiende a las Instituciones que financiaron la mayor parte de estos estudios: Facultad de Ciencias, Universidad de Chile; Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (Chile) y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Argentina).

A FEDERICO GARCÍA ROMEU expreso mi profundo agradecimiento; gran amigo a quien debo mi iniciación en la disciplina científica. Su espíritu crítico e inquieto y su sólida preparación académica fueron un estímulo permanente para mí.

Un párrafo aparte merece MARISA, mi esposa, quien está, literalmente, detrás de cada letra o número de este trabajo.

A MARISA y a FEDERICO dedico este esfuerzo.

RESUMEN

Se estudiaron los mecanismos de transporte de Cl^- y de Na^+ a través de la piel *in situ* de tres anfibios sudamericanos: *Leptodactylus ocellatus*, *Bufo arunco* y *Calyptocephalella caudiverbera*. En las tres especies fue posible demostrar que ambos iones pueden ser captados desde la solución externa de manera independiente. Los animales son capaces, además, de ganar Cl^- o Na^+ desde soluciones en las que el co-ión es impermeante (colina o sulfato).

En *C. caudiverbera* es posible inhibir la captación de Na^+ por adición de H_2SO_4 o procaína al baño externo; la adición de pentobarbital provoca la inhibición del transporte de Cl^-. La captación de Cl^- a través de la piel de esta especie se hace por intercambio con HCO_3^- endógeno; el Na^+ se capta por intercambio con H^+. En *L. ocellatus*, una parte del Na^+ se intercambia por NH_4^+ endógeno.

La inyección de hormonas neurohipofisarias a *C. caudiverbera* provoca la pérdida de aquélla capacidad de absorber Cl^- y Na^+ en forma independiente. Después de inyectar ocitocina o vasotocina, las ranas ganan dichos iones a la misma velocidad (flujos netos paralelos); la inyección de mesotocina provoca la pérdida neta de Cl^- y de Na^+, también a la misma velocidad.

SUMMARY

The Cl— and Na+ transport mechanism through the *in vivo* skin of three South American amphibians *Leptodactylus ocellatus*, *Bufo arunco* and *Calyptocephalella caudiverbera*, were studied. It was demonstrated that these species are able to take up Cl— and Na+ from the external solution independently. They are able, in addition, to take up Cl— or Na+ from solutions which the accompanying co-ion is impermeant (choline or sulfate).

In *C. caudiverbera* it is possible to inhibit the uptake of Na+ by addition of H_2SO_4 or procaine to the external medium; adding pentobarbital the Cl— is by exchange against endogenous HCO_3^-; the Na+ is exchanged against H+. In *L. ocellatus*, part of the Na+ is exchanged against endogenous NH_4^+.

The injection of neurohypophysial hormones to *C. caudiverbera* produces the lack of that capacity of independent Cl— and Na+ uptake. After injection of oxytocin or vasotocin, frogs take up these ions at the same velocity (parallel net fluxes); the injection of mesotocin produces net loss of Cl— and Na+, a the same velocity too.

BIBLIOGRAFIA

ACEVES, J., D. ERLIJ y C. EDWARDS.

1968 Na+ transport across the isolated skin of *Ambystoma mexicanus*. Biochim. Biophys. Acta *150:* 744-746.

ACEVES, J., D. ERLIJ y G. WHITTEMBURY.

1970 The role of the urinary bladder in water balance of *Ambystoma mexicanum*. Comp. Biochem. Physiol. *33:* 39-42.

AGUIRRE, M., R. CABELLO, J. LAZCANO, A. MANCILLA, B. HOLMGREN y A. VELOSO.

1969 Respuesta cardíaca a la inmersión en diferentes especies de anuros chilenos. Arch. Biol. Med. Exp. *6:* R 1.

ALVARADO, R. H.

1972 The effects of dehydration on water and electrolytes in *Ambystoma tigrinum*. Physiol. Zoöl. *45:* 43-53.

ALVARADO, R. H. y A. MOODY.

1970 Sodium and chloride transport in tadpoles of the bullfrog *Rana catesbeiana*. Am. J. Physiol. *218*: 1510-1516.

ALVARADO, R. H. y D. F. STIFFLER.

1970 The transepithelial potential difference in intact larval and adult salamanders. Comp. Biochem. Physiol. *33*: 209-22.

BALINSKY, J. B.

1970 Nitrogen metabolism in amphibians. En: *Comparative biochemistry of nitrogen metabolism*, 2, The Vertebrates, Editor J. W. Campbell, Academic Press, New York. Páginas 519-637.

BALINSKY, J. B. y E. BALDWIN.

1961 The mode of excretion of ammonia and urea in *Xenopus laevis*. *J. Exp. Biol. 38*: 695 - 705.

BENTLEY, P. J.

1966 *a* Adaptation of Amphibia to arid environment. Science. *152*: 619-623.

1966 *b* The physiology of the urinary bladder of Amphibia. Biol. Rev. *41*: 275-316.

1969 a Comparison of actions of neurohypophysial hormones in Amphibia. Colloques intern. CNRS. *177*, París: 57-62.

1969 b Neurohypophysial function in Amphibia: hormone activity in the plasma. J. Endocrinol. *43*: 359-369.

1971 *Endocrines and osmoregulation. A comparative account of the regulation of water and salt in vertebrates.* Springer-Verlag, Berlin.

1973 Role of the skin in Amphibian sodium metabolism. Science. *181*: 686-687.

BENTLEY, P. J. y A. R. MAIN.

1972 Zonal differences in permeability of the skin of some anuran Amphibia. Am. J. Physiol. *223*: 361-363.

BIBER, T. U. L., R. A. CHEZ y P. F. CURRAN.

1966 Na transport across frog skin at low external Na concentration. J. gen. Physiol. *49*: 1161-1176.

BLAUSTEIN, M. P. y D. E. GOLDMAN

1966 Action of anionic and cationic nerveblocking agents: experiment and interpretation. Science *153*: 429-432.

BROWN, A. C.

1962 Current and potential of frog skin *in vivo* and *in vitro*. J. Cell. comp. Physiol. *60*: 263-270.

CARASSO, N., P. FAVARD, S. JARD y R. M. RAJERISON

1971 The isolated frog skin epithelium. I. Preparation and general structure in different physiological states. J. Microsc. *10*: 315-330.

CARLISKY, N. J., M. CEREIJIDO, A. BARRIO y G. MIGLIORA.

1970 Studies on the relationship between sodium and water balance and renal mechanisms of excretion of urea in Amphibia. Comp. Biochem. Physiol. *36*: 321-337.

CARLISKY, N. J.

1970 Urea excretion and arginase in anuran kidney. En: *Urea and the kidney*, Editor B. Schmidt-Nielsen, Excerpta Medica, International Congress Series *195:* 263-271.

CARROLL, R. L.

1970 Quantitative aspects of the Amphibian-Reptilian transition. Forma et functio. *3*: 165-178.

CASAMIQUELA, R. M.

1963 Sobre un par de anuros del Mioceno de Río Negro (Patagonia) *Wawelia gerholdi* n. gen et sp (*Ceratophrydidae*) y *Gigantobatrachus parodii* (*Leptodactylidae*). Ameghiniana *3*: 141-157.

CEI, J. M.

1962 *Batracios de Chile*. Ediciones de la Universidad de Chile, Santiago.

CEREIJIDO, M, F. C. HERRERA, W. J. FLANIGAN y P. F. CURRAN.

1964 The influence of Na concentration on Na transport across frog skin. J. gen. Physiol. *47:* 879-893.

CEREIJIDO, M., J. H. MORENO, I. REISIN, E. RODRÍGUEZ, C. A. ROTUNNO y E. A. ZYLBER.

1973 On the mechanism of sodium movement across epithelia. Ann. N. Y. Acad. Sc. *204:* 310-324.

CEREIJIDO, M., I. REISIN y C. A. ROTUNNO.

1968 The effect of sodium concentration on the content and distribution of sodium in the frog skin. J. Physiol., London *196:* 237-253.

CEREIJIDO, M. y C. A. ROTUNNO.

1970 *Introduction to the study of biological membranes*, Gordon and Breach Science Publishers, New York.

CRABBE, J.

1963 *The sodium-retaining action of aldosterone*, Presses Academiques Europeens, Bruxelles.

CRIM, J. W.

1972 Studies on the possible regulation of plasma sodium by prolactin in Amphibia. Comp. Biochem. Physiol. *43* A: 349-357.

CZOPEK, J.

1962 Vascularization of respiratory surfaces in some Caudata. Copeia *3:* 576-587.

1967 Changes in the skin of *Rana temporaria* L produced by prolonged submersion. Acta anat. *68:* 300-305.

DAVENPORT, H. W.

1966 El ABC de la química ácido-base, EUDEBA, Buenos Aires.

DAVSON, H.

1970 *A textbook of general physiology*, Fourth Edition, Volumen I, The Williams and Wilkins Company, Baltimore.

DICKER, S. E.

1970 The skin and bladder of Amphibians as models for the mammalian nephron. Hormones *1:* 352-363.

DIETZ, T. H. y R. H. ALVARADO.

1970 Osmotic and ionic regulation in *Lumbricus terrestris*. Biol. Bull. *138:* 247-254.

DIETZ, T. H., L. B. KIRSCHNER y D. PORTER.

1967 The roles of sodium transport and anion permeability in generating transepithelial potential differences in larval salamanders. J. exp. Biol. *46:* 85-96.

DOBSON, J. G. y G. W. KIDDER.

1968 Edge damage effect in in vitro frog skin preparations. Am. J. Physiol. *214:* 719-724.

DONOSO-BARROS, R.

1970 Catálogo herpetológico chileno. Bol. Mus. Nac. Hist. Nat. Stgo. *31:* 49-124.

EMILIO, M. G., M. M. MACHADO y H. P. MENANO.

1970 The production of a hydrogen ion gradient across the isolated frog skin. Quantitative aspects and the effect of acetazolamide. Biochim. Biophys. Acta *203:* 394-409.

ERLIJ, D.

1971 Salt transport across isolated frog skin. Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B. *262:* 153-161.

ESPINA, S. y M. ROJAS.

1972 A comparison of the size of the urinary bladder of two South American anurans of different habitat. Comp. Biochem. Physiol. *41* A: 115-119.

FANELLI, G. M. y L. GOLDSTEIN.

1964 Ammonia excretion in the neotenous newt, *Necturus maculosus* (Rafinesque). Comp. Biochem. Physiol. *13:* 193-204.

FARQUHAR, M. G. y G. E. PALADE.

1964 Functional organization of amphibian skin. Proc. Nat. Acad. Sc. (USA) *51:* 569-577.

1965 Cell junctions in amphibian skin. J. cell Biol. *26:* 263-291.

1966 Adenosine triphosphatase localization in amphibian epidermis. J. cell. Biol. *30:* 359-379.

FERREIRA, K. T. G.

1968 Anionic dependence of sodium transport in the frog skin. Biochim. Biophys. Acta. *150:* 587-598.

1973 Kinetic characterization of the chloride dependence of sodium transport in the frog skin. Biochim. Biophys. Acta. *291:* 269-273.

FISCHBARG, J., J. A. ZADUNAISKY y F. W. DE FISCH.

1967 Dependence of sodium and chloride transports on chloride concentration in isolated frog skin. Am. J. Physiol. *213:* 963-969.

FLEMING, W. R.

1957 On the role of hydrogen ion and potassium ion in the active transport of sodium across the isolated frog skin. J. Cell. comp. Physiol. *49:* 129-136.

FOLLET, B. K.

1970 Effects of neurohypophysial hormones and their synthetic analogues on lower vertebrates. Intern. Encyclop. Pharm. Therap. *1:* 321-350.

FOXON, G. E. H.

1964 Blood and respiration. En: *Physiology of the Amphibia*, Editor J. A. Moore, Academic Press, New York.

FRIEDMAN, R. T., R. M. AIYAWAR, W. D. HUGHES y E. G. HUF.

1967 Effect of NH_4-ions on acid-base properties and ion movements in isolated frog skin. Comp. Biochem. Physiol. *23:* 847-869.

FRIEDMAN, R. T., N. S. LAPRADE, R. M. AIYAWAR y E. G. HUF.

1967 Cremical basis for the [H^+] gradient across frog skin. Am. J. Physiol. *212:* 962-972.

FUNDER, J., H. H. USSING y J. O. WIETH.

1967 The effects of CO_2 and hydrogen ions on active Na transport in the isolated frog skin. Acta physiol. Scand. *71:* 65-76.

GANS, C.

1970 Strategy and sequence in the Evolution of the external gas exchangers of ectothermal vertebrates. Forma et Functio *3:* 61-104.

GARCÍA ROMEU, F. y J. MAETZ.

1964 The mechanism of sodium and chloride uptake by the gills of a fresh-water fish, *Carassius auratus*. I. Evidence for an independent uptake of sodium and chloride ions. J. gen. Physiol. *47:* 1195-1207.

GARCÍA ROMEU, F.

1971 Anionic and cationic exchange mechanisms in the skin of anurans, with special reference to Leptodactylidae *in vivo*. Phil. Trans. Roy. Soc. London B *262:* 163-174.

GONZÁLEZ, C., J. SÁNCHEZ y J. CONCHA.

1966 Changes in potential difference and short-circuit current produced by electrical stimulation in a nerve-skin preparation of the toad. Biochim. Biophys. Acta *120:* 186-188.

1967 Further evidence for the release of noradrenaline under nerve stimulation and its effect on the potential difference in a toad nerve-skin preparation. Biochim. Biophys. Acta. *135:* 167-170.

1969 Influence of adrenergic or blocking drugs on the electrical potential profiles in the isolated toad skin. Arch. Biol. Med. Exp. *6:* 60-62.

GONZÁLEZ, D., R. VALLEJOS y F. DELGADO.

1969 Hemograma periférico de invierno de Caliptocephalella Gayi (Dumeril y Bibron) (Amphibia, Salientia, Leptodactylidae). Acta cient. Venezol. *20:* 58-60.

GÜNTHER, B. y E. MICCO.

1954 Metabolismo de algunos anfibios en función del peso corporal. Bol. Soc. Biol. Concepción. *29:* 57-72.

HELMAN, S. I. y D. A. MILLER.

1971 In vitro techniques for avoiding edge damage in studies of frog skin. Science *173:* 146-148.

HELLER, H.

1965 Osmoregulation in Amphibia. Arch. Anat. Microsc. *54:* 471-490.

HELLER, H. y B. T. PICKERING.

1970 The distribution of vertebrate neurohypophysial hormones and its relation to possible pathways for their evolution. Intern. Encyclop. Pharm. Therap. *1:* 59-79.

HERRERA, F. C.

1971 Frog skin and toad bladder. En: *Membranes and ion transport*, Editor E. E. Bittar, Wiley, Interscience, Volumen 3, Páginas 1-47.

HOSHIKO, T., B. D. LINDLEY y C. EDWARDS

1964 Diffusion delay in frog skin connective tissue: a source of error in tracer investigations. Nature *201:* 932-933.

HUF, E.

1935 Versuche über den Zusammenhang swischen Stoffwechsel, Potentialbildung und Funktion der Froschhaut. Pflüger Arch. *235:* 655-673.

HUF, E. G., J. P. WILLS y M. F. ARRIGHI.

1955 Electrolyte distribution and active salt uptake in frog skin. J. gen. Physiol. *38:* 867-888.

HUTCHISON, V. H., W. G. WHITFORD y M. KOHL.

1968 Relation of body size and surface area to gas exchange in Anurans. Physiol. Zoöl. *41:* 65-85.

JARD, S.

1966 Etude des effects de la vasotocine sur l'excrétion de l'eau et des electrolytes par le rein de la grenouille *Rana esculenta* L.: Analyse à l'aide d'analogues artificiels de l'hormone naturelle des caractères structuraux requis pour son activité biologique. J. Physiol. Paris *58* Suppl. XV: 1-124.

JOHANSEN, K. y C. LENFANT.

1972 A Comparative approach to the adaptability of O_2HB affinity. En: *The 4 th. Alfred Benzon Symposium: O_2 affinity of hemoglobin and red cell and acid-base status.* Editor P. Astrup.

JORGENSEN, C. B., H. LEVI y K. ZERAHN.

1954 On active uptake of sodium and chloride ions in Anurans. Acta physiol. Scand. *30:* 178-190.

JUST, J. J., R. N. GATZ y E. C. CRAWFORD.

1973 Changes in respiratory functions during metamorphosis of the bullfrog, *Rana catesbeiana.* Resp. Physiol. *17:* 276-282.

KERSTETTER, T. H., L. B. KIRSCHNER y D. RAFUSE.

1970 On the mechanism of sodium ion transport by the irrigated gills of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. gen. Physiol. *56:* 342-359.

KEYNES, R. D.

1969 From frog skin to sheep rumen: a survey of transport of salts and water across multicellular structures. Q. Rev. Biophys. *2:* 177-281.

KIRSCHNER, L. B.

1960 Permeability of frog skin to choline. Science *132:* 85-86.

1970 The study of NaCl transport in aquatic animals. Am. Zool. *10:* 365-376.

KIRSCHNER, L. B., L. GREEWALD y T. H. KERSTETTER.

1973 Effect of amiloride on sodium transport across body surfaces of freshwater animals. Am. J. Physiol. *224:* 832-837.

KOEFOED-JOHNSEN, V. y H. H. USSING.

1958 The nature of the frog skin potential. Acta physiol. Scand. *42:* 298-308.

KROGH, A.

1937 Osmotic regulation in the frog (R. esculenta) by active absorption of chloride ions. Skand. arch. Physiol. *76:* 60-74.

1939 *Osmotic regulation in aquatic animals,* Cambridge University Press (reimpreso por Dover Publications, New York).

LAHLOU, B.

1970 La fonction rénale des téléostéens et son role dans l'osmo-régulation. Bull. Inf. Scientif. Techn. Comm. Energie Atom. (France) *144* (Janvier): 17-52.

LENFANT, C. y K. JOHANSEN.

1967 Respiratory adaptations in selected amphibians. Resp. Physiol. *2:* 247-260.

1972 Gas exchange in gill, skin, and lung breathing. Resp. Physiol. *14:* 211-218.

LINDLEY, B. D.

1970 Fluxes across epithelia. Am. Zool. *10:* 355-364.

LYNCH, J. D.

1971 Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of Leptodactyloid frog. Univ. Kansas Mus. Nat. Hist. Misc. Publ. *53:* 1-238.

MACEY, R. I. y D. C. KOBLICK.

1963 Effects of choline and other quaternary ammonium compounds on Na movements in frog skin. Am. J. Physiol. *205:* 1063-1066.

MACROBBIE, E. A. C.

1970 The active transport of ions in plant cells. Q. Rev. Biophys. *3:* 251-294.

MAETZ, J.

1956 Les échanges de sodium chez le poisson *Carassius auratus* L. Action d'un inhibiteur de l'anhydrasse carbonique. J. Physiol. Paris *48:* 1085-1099.

1968 Salt and water metabolism. En: *Perpectives in endocrinology. Hormones in the lives of lower vertebrates.* Editores HE. J. W. Barrington y C. Barker Jorgensen, Academic Press, London, páginas 47-162.

1970 Mechanisms of salt and water transfer across membranes in teleosts in relation to the aquatic environment. Mem. Soc. Endocrinol. *18:* 3-29.

Maetz, J.

1971 Fish gills: mechanisms of salt transfer in fresh water and sea water. Phil. Trans. Roy. Soc. London B *262:* 209-249.

1972 Branchial sodium exchange and ammonia excretion in the goldfish *Carassius auratus.* Effects of ammonia-loading and temperature changes. J. exp. Biol. *56:* 601-620.

1973 Na^+/NH_4^+, Na^+/H^+ exchanges and NH_3 movement across the gill of *Carassius auratus.* J. exp. Biol. *58:* 255-275.

Maetz, J. y F. García Romeu.

1964 The mechanism of sodium and chloride uptake by the gills of a fres water fish, *Carassius auratus.* II. Evidence for NH_4^+/Na^+ and HCO_3^-/Cl^- exchanges. J. gen. Physiol. *47:* 1209-1227.

Maren, T. H.

1967 Carbonic anhydrase: chemistry, physiology and inhibition. Physiol. Revs. *47:* 595-781.

Martin, D. W.

1964 Reversed potentials of isolated frog skin. J. Cell comp. Physiol. *63:* 245-251.

Martin, D. W. y Curran, P. F.

1966 Reversed potentials in isolated frog skin II. Active transport of chloride. J. Cell comp. Physiol. *67:* 367-374.

Moens, L.

1972 Isolation of neurohypophysial hormones of *Rana temporaria.* Nature *237:* 268-269.

Morel, F. y S. Jard.

1968 Actions and functions of the neurohypophysial hormones and related peptides in lower vertebrates. En: *Neurohypophysial hormones and similar polypeptides.* Editor B. Berde, Springer-Verlag, Berlin, Páginas 655-716.

Moreno, J. H., I. L. Reisin, E. Rodríguez, C. A. Rotunno, y M. Cereijido.

1973 Barriers to sodium movement across frog skin. J. Membrane Biol. *11:* 99-115.

Motais, R.

1967 Les mécanismes d'éxchanges ioniques branquiaux chez les téléostéens. Ann. Inst. Océanogr. *45:* 1-83.

Motais, R. y F. García Romeu.

1972 Transport mechanism in the teleostean gill and amphibian skin. Ann. Rev. Physiol. *34:* 141-176.

Norris, B. J. Concha, C. González y J. Sánchez.

1972 Relation between the corium glands and the effects of catecholamines and acetylcholine on toad skin potential. Acta physiol. Latinam. *22:* 38-44.

Nutbourne, D. M.

1968 The effect of small hydrostatic pressure gradiets on the rate of active sodium transport across isolated living frogskin membranes. J. Physiol. London *195:* 1-18.

Payan, P. y J. Maetz.

1973 Branchial sodium transport in *Scyliorhinus canicula:* evidence for Na^+/NH_4^+ and Na^+/H^+ exchanges and for a role of carbonic anhydrase. J. exp. Biol. *58:* 487-502.

Péfaur, J.

1972 Gondwana, deriva continental y fósiles antárticos. Boletín de Difusión INACH *7:* 7-12.

Prosser, C. D. y F. A. Brown.

1965 *Comparative animal physiology.* W. B. Saunders Co., Philadelphia.

Rahn, H.

1966 a Aquatic gas exchange: theory. Resp. Physiol. *1:* 1-12.

1966 b Evolution of the gas transport system in vertebrates. Proc. Roy. Soc. Med. *59:* 493-494.

Rawlins, F., L. Mateu, F. Fragachan y G. Whittembury.

1970 Isolated toad skin epithelium: transport characteristics. Pflügers Arch. *316:* 64-80.

Redfield, A. C.

1933 The evolution of respiratory function of the blood. Q. Rev. Biol. *8:* 31-57.

Robin, E. D., P. A. Bromberg y C. E. Cross.

1969 Some aspects of the evolution of vertebrate acid-base regulation. Yale J. Biol. Med. *41:* 448-467.

Romer, A. S.

1972 Skin breathing — Primary or secondary? Resp. Physiol. *14:* 183-192.

1973 L'origine des classes de vertébrés. La Recherche *4:* 347-361.

Rorunno, C. A. y M. Cerejido.

1966 Movimiento y distribución de sodio en membranas epiteliales. Acta Physiol. Latinoam. *16:* (Supl. Nº 2): 270-276.

SALÉE, M. L. y M. VINDREQUIN-DELIÈGE.

1967 Nervous control of the permeability characteristics on the isolated skin of the toad *Bufo bufo* L. Comp. Biochem. Physiol. *23:* 583-597.

SÁNCHEZ, J., C. GONZÁLEZ y J. CONCHA.

1966 Influencia de la estimulación nerviosa sobre la corriente de corto-circuito y diferencia de potencial en un trozo de piel aislada de sapo. Arch. Biol. Med. Exp. *3:* 79-84.

SANDERSON, P. H.

1952 Potentiometric determination of chloride in biological fluids. Biochem. J. *52:* 502-505.

SAWYER, W. H.

1968 Phylogenetic aspects of the neurohypophysial hormones. En: *Neurohypophysial hormones and similar polypeptides.* Editor B. Berde, Springer-Verlag, Berlín, Páginas 717-747.

1972 Lungfishes and amphibians: endocrine adaptation and the transition from aquatic to terrestrial life. Fed. Proc. *31:* 1609-1614.

SCHAEFFER, B.

1969 Adaptative radiation of the fishes and the fish-amphibian transition. Ann. N.Y. Acad. Sc. *167:* 5-17.

SCHMALHAUSEN, I. I.

1968 *The origin of terrestrial vertebrates.* Academic Press, New York.

SCHOFFENIELS, E. y M. L. SAEÉE.

1965 The effects of the electrical stimulation of the brachial plexus on the potential difference of frog skin. Comp. Biochem. Physiol. *14:* 587-602.

SCHOFFENIELS, E. y R. R. TERCAFS.

1965/66 L'osmorégulation chez les batraciens. Ann. Soc. Roy. Zool. Belgique *96:* 23-29.

SHAW, J.

1959 The absorption of sodium ions by the crayfish, *Astacus pallipes* Lereboullet. I. The effect of external and internal sodium concentrations. J. exp. Biol. *36:* 126-144.

1960 a The absortion of sodium ions by the crayfish *Astacus pallipes* Lereboullet. II. The effect of the external anion. J. exp. Biol. *37:* 534-547.

1960b The absorption of chloride ions by the crayfish, *Astacus pallipes* Lereboullet. J. exp. Biol. *37:* 557-572.

SHOEMAKER, V. H.

1964 The effects of dehydration on electrolyte concentrations in a toad. *Bufo marinus.* Comp. Biochem. Physiol. *13*: 261-271.

SLAYMAN, C. L. y C. W. SLAYMAN.

1968 Net uptake of potassium in *Neurospora*: exchange for sodium and hydrogen ions. J. gen. Physiol. *52:* 424-430.

SNELL, F. M. y O. R. MC INTYRE.

1960 The effects of carbon dioxide and hydrogen ion on sodium transport in isolated frog skin. Biochim. Biophys. *Acta 41:* 89-98.

STOBBART, R. H.

1965 The effect of some anions and cations upon the fluxes and net uptake of sodium in the larva of *Aedes aegypti* (L.) J. exp. Biol. *42:* 29-43.

1967 The effect of some anions and cations upon the fluxes and net uptake of chloride in the larva of *Aedes aegypti* (L.), and the nature of the uptakes mechanisms for sodium and chloride. J. exp. Biol. *47:* 35-57.

1971 Evidence for $N+/H+$ and $Cl-HCO_3-$ exchanges during independent sodium and chloride uptake by the larva of the mosquito *Aedes aegypti* (L.) J. exp. Biol. *54:* 19-27.

SZARSKI, H.

1962 The origin of the Amphibia. Q. Rev. Biol. *37:* 189-241.

THOMSON, K. S.

1971 The adaptation and evolution of early fishes. Q. Rev. Biol. *46:* 139-166.

TORELLI, G. F. CELENTANO, G. CORTILI y G. GUELLA.

1968 Dispositivo per la misura del potenziale di membrana su pelle di rana *in vivo. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 44*: 501-504.

USSING, H. H.

1949 The active transport through the isolated frog skin in the light of tracer studies. Acta physiol, Scand. *17:* 1-37.

1960 The frog skin potential. J. gen. Physiol. *43:* (Suppl.): 135-147.

1969 Summary address. En: *The molecular basis of membrane function.* Editor D.C. Tosteson, Prentice Hall Ins, New Jersey.

USSING, H. H. y K. ZERAHN.

1951 Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. Acta physiol. Scand. *23:* 110-115.

VAN LENNEP, E. W. y H. KOMNICK.

1971 Histochemical demonstration of sodium and chloride in the frog epidermis. Cytobiologie *3:* 137-151.

VOÛTE, C. L. y H. H. USSING.

1968 Some morphological aspects of active sodium transport. The epithelium of the frog skin. J. Cell Biol. *36:* 625-638.

WHITFORD, W. G.

1973 The effects of temperature on respiration in the Amphibia. Am. Zool. *13:* 505-512.

WHITFORD, W. G. y V. H. HUTCHISON.

1965 Gas exchange in salamanders. Physiol. Zoöl. *38:* 228-242.

ZADUNAISKY, J. A., O. A. CANDIA y D. J. CHIARANDIN.

1963 The origin of the short —circuit current in the isolated skin of the South American frog *Leptodactylus ocellatus*. J. gen. Physiol. *47:* 393-402.